

Charakterisierung der humanen 5-Lipoxygenase als direktes Targetgen des Tumorsuppressors p53 und seine Relevanz für die Tumorgenese



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT



GOETHE
UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

GEORG SPEYER HAUS
INSTITUTE FOR TUMOR BIOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY



Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung
des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Bianca Gilbert

aus Frankfurt a.M.

1. Referent: Prof. Dr. Beatrix Süß
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
3. Referent: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Tag der Einreichung: 05. Mai 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2015

Darmstadt 2015

D17

Chuck Norris'tears cure cancer. Too bad he has never cried.

Chuck Norris

Meiner Familie gewidmet

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Bianca Gilbert, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, sind als solche kenntlich gemacht.

Des Weiteren versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Frankfurt, den 05. Mai 2015

Dipl. –Biol. Bianca Gilbert

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 Pathogenese maligner Tumoren.....	1
1.2 Der Tumorsuppressor p53.....	3
1.3 Regulation der Aktivität von p53.....	4
1.3.1 Regulation des Zellzyklus.....	4
1.3.2 Induktion von Apoptose	6
1.3.3 Negative Regulation von p53 durch MDM2.....	8
1.3.4 Einleitung der zellulären Stressantwort durch p53	8
1.3.4 Proteinstruktur von p53.....	9
1.3.5 Stabilisierung und Aktivierung von p53 durch Post-translationale Modifikationen	11
1.3.6 Posttranslationale Modifikationen von p53 und deren Einfluss auf die selektive Targetgen- regulierung.....	12
1.3.7 Sequenzspezifische Bindung von p53 an Response-Elemente.....	12
1.4 Mutationen.....	14
1.5 Die humane 5-Lipoxygenase (5-LO).....	16
1.5.1 Lipoxygenasen.....	16
1.5.2 Biosynthese und Physiologie der Leukotriene.....	17
1.5.3 Von der chronischen Entzündung zur Krebsentstehung - die mögliche Funktion der 5-LO und der Eicosanoide in der Tumorgenese	18
1.6 NF- κ B als zentraler Faktor in der Pathogenese chronischer Entzündungen in Korrelation mit Krebs.....	21
1.7 Regulation der 5-LO	22
1.7.1 Struktureller Aufbau der 5-LO	22
1.7.2 Transkriptionelle Regulation der 5-LO-Expression.....	23
1.7.3 Regulation der zellulären 5-LO Aktivität.....	26
1.8 Interaktionspartner der 5-LO	28
1.9 Bisherige Studien zu potenziellen Interaktion zwischen p53 und 5-LO	28
Zielsetzung.....	30

2	Material und Methoden	31
2.1	Materialien	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Einwegmaterialien.....	32
2.1.3	Geräte	33
2.1.4	Verwendete Kits.....	35
2.1.5	Verwendete Beads	35
2.1.6	Verwendete Enzyme und Reagenzien	36
2.1.7	Verwendete Primärantikörper	37
2.2	Methoden der Zellkultur	38
2.2.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	38
2.2.2	Zellkulturmedien	39
2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	39
2.2.4	Zellzahlbestimmung mittels elektronischem Zellzählgerät.....	40
2.2.5	Behandlung der Zellen mit Zytostatikum.....	40
2.2.6	Zellextraktion.....	40
2.2.7	SDS-Page	41
2.2.8	Western Blot.....	42
2.2.9	Entfernen gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen nach Li-COR®	43
2.2.10	RNA-Isolierung und darauffolgende cDNA-Synthese.....	43
2.2.11	Quantitative RT-qPCR (Real-time PCR)	44
2.2.12	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	47
2.2.13	Oligonukleotide-Pull-Down-Analyse (OPDA)	50
2.2.14	Immunfluoreszenz	51
2.2.15	Lokalisationsassay	53
2.2.16	Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	53
2.2.17	Transfektion von Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	54
2.2.18	Calcium-Phosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln.....	55
2.2.19	Transduktion von Zellen	55
2.2.20	Propidiumiodid Färbung (PI).....	55
2.2.21	AnnexinV-FITC/PI-Färbung.....	56
2.2.22	Zellviabilitätsassay – Kristallviolettffärbung	56
2.2.23	Caspase-3 Assay.....	57
2.2.24	5-LO-Assay in Zellhomogenaten	58

2.2.25	Reporter-Gen-Assay (Luciferase-Assay).....	58
2.3	Molekularbiologische Methoden	59
2.3.1	Extraktion von genomischer DNA aus U2OS-Zellen	59
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der genomische DNA	59
2.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	60
2.3.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	60
2.3.5	DNA - Restriktionsanalyse	61
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	61
2.3.7	Transformation von Bakterien	61
2.3.8	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- bzw. Maxipräparation).....	62
2.4	Statistische Analysen	65
3	Ergebnisse.....	66
3.1	Einfluss von Actinomycin D (Act.D) und Etoposid (Eto) auf den Zellzyklus von U2OS-Zellen	66
3.2	Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch DNA-schädigende Stress-Stimuli	68
3.3	ChIP-Seq-basierte Identifizierungen genomweiter DNA-Bindestellen von p53..	69
3.3.1	Bindung des wtp53 Proteins an die chromosomalen <i>MDM2</i> , <i>CDKN1A</i> und <i>BAX</i> Promotoren	70
3.3.2	Identifizierung von <i>ALOX5</i> als potenzielles Targetgen von p53	73
3.3.3	Chromatin-Immunopräzipitation zur Quantifizierung von Protein-DNA-Komplexen.....	75
3.3.4	Quantifizierung der Protein-DNA-Komplexbildung mittels Oligo-Pull-Down-Assay	78
3.4	p53 vermittelte Expression von <i>ALOX5</i> bzw. der humanen 5-Lipoxygenase.....	80
3.4.1	5-LO-Expressionsanalyse in p53-Wildtyp-Zellen.....	80
3.4.2	p53-abhängige Transaktivierung endogener Targetgene.....	84
3.4.3	Nachweis der p53-abhängigen <i>ALOX5</i> -Expression in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (HCT116)	86
3.4.4	„Loss of function“ in p53-mutierten Zelllinien	89
3.4.5	Validierung der p53-abhängigen Expression der 5-LO durch gezielten Knockdown von p53	91
3.5	5-LO-Aktivitätsassay in Zellhomogenaten nach Behandlung der Zellen mit Act.D und Eto.....	95
3.6	Reportergenanalysen zur Untersuchung der 5-LO-Promotor/p53 Enhancer-Aktivität	97
3.7	Biologische Relevanz der humanen 5-Lipoxygenase	99

3.7.1	Induktion und Lokalisation von p53 und 5-LO nach DNA-schädigenden Einflüssen	99
3.7.2	Kolokalisation von 5-LO mit p53 im Nukleus	101
3.7.3	Identifizierung der humanen 5-LO als Interaktionspartner von wtp53	104
3.7.4	Co-IP von transfizierten und behandelten Ganzzelextrakten von U2OS-Zellen	105
3.7.5	Co-IP mit rekombinanter 5-LO und behandelter Ganzzelextrakte von HEK293T-Zellen.....	106
3.7.6	Expressionsanalysen p53-regulierter Targetgene nach 5-LO-Überexpression.....	107
3.7.7	Reportergenanalysen zur Untersuchung des Einflusses der 5-LO auf die p53-Promotor-/Enhancer-Aktivität.....	118
3.8	Phänotypische und genotypische Charakterisierung von 5-LO-Knockdown-Zellen	121
3.8.1	5-LO-Knockdown in U2OS- und HCT116-Zellen	121
3.8.2	Genotypische Charakterisierung p53-regulierter Targetgene in 5-LO-Knockdown-Zellen.	124
3.8.3	Phänotypische Charakterisierung von 5-LO-Knockdown-Zellen; Bestimmung der <i>in vitro</i> -Zellproliferation mittels eines Kristallviolett-Assays.....	131
3.8.4	Bestimmung der frühen Apoptose mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung.....	134
4	Diskussion.....	136
4.1	Pharmakologie von Actinomycin D und Etoposid	136
4.2	Transkriptionelle Regulation der 5-Lipoxygenase durch den Transkriptionsfaktor p53	136
4.2.1	Identifikation von <i>ALOX5</i> als neues Targetgen von p53	136
4.2.2	Mögliche p53-Interaktionspartner der Transkriptionsmaschinerie von <i>ALOX5</i>	139
4.2.3	Regulation der zellulären 5-LO-Expression in Abhängigkeit von wtp53.....	142
4.2.4	Möglicher Einfluss von mutp53 auf die 5-LO-Regulation.....	144
4.2.5	5-LO Aktivität – Induktion der Leukotrienbiosynthese durch p53	145
4.2.6	p53 als posttranskriptioneller Regulator der 5-LO und COX-2.....	146
4.3	Biologische Relevanz der transkriptionellen Regulation der 5-LO durch p53..	147
4.3.1	Kolokalisation der Proteine p53 und 5-LO	147
4.3.2	Bindung der humanen 5-Lipoxygenase an den Transkriptionsfaktor p53.	149
4.3.3	Effekt der 5-LO Überexpression auf die Expression p53-regulierter Targetgene	150

4.3.4	Einfluss von überexprimiertem Wildtyp-p53 sowie überexprimierter 5-LO auf die 5-LO-Promotor/Enhancer-Aktivität.....	151
4.3.5	Inaktivierung der <i>ALOX5</i> -Expression durch gezielten 5-LO-Knockdown....	152
	Hypothese	154
	Zusammenfassung.....	157
	Referenzen.....	158
	Anhang	XII
	Danksagung.....	XXV
	Curriculum Vitae	XXVII

Abbildungen

Abbildung 1. Anzahl der Krebserkrankungen bei Frauen.....	2
Abbildung 2. Anzahl der Krebserkrankungen bei Männern.....	2
Abbildung 3. Zellzyklusregulation durch Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline.	5
Abbildung 4. Apoptose-Signalweg.....	7
Abbildung 5. Möglichkeiten der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress.	9
Abbildung 6. Struktureller Proteinaufbau von p53.	10
Abbildung 7. Einfluss von <i>Trans</i> - und <i>Cis</i> -Faktoren auf die transkriptionelle Aktivität von p53.....	14
Abbildung 8. Hotspot-Mutationen von p53.....	15
Abbildung 9. Entstehung von Krebs.	20
Abbildung 10. Schematische Darstellung des Gens <i>ALOX5</i>	24
Abbildung 11. Regulation der zellulären 5-LO Aktivität nach Rådmark <i>et al.</i> [135].	27
Abbildung 12. Einfluss von Act.D und Eto auf den Zellzyklus in U2OS-Zellen.	67
Abbildung 13. Expression von <i>TP53</i> in U2OS-Zellen.	68
Abbildung 14. Genomweite ChIP-Seq-Analyse bekannter Bindestellen von p53.....	72
Abbildung 15. Strukturaufbau des <i>ALOX5</i> -Gens.	73
Abbildung 16. Genomweite ChIP-Seq-Analyse von p53 an die Bindesequenz von <i>ALOX5</i>	74
Abbildung 17. Chromatin-Immunopräzipitation für p53-DO-1.	76
Abbildung 18. Chromatin-Immunopräzipitation für p53-K320.....	77
Abbildung 19. Oligo-Pulldown-Assay.....	79
Abbildung 20. Expression von <i>ALOX5</i> in U2OS- und MCF7-Zellen.....	81
Abbildung 21. Western Blot Analyse des 5-LO-Proteins in U2OS- und MCF7-Zellen.	82
Abbildung 22. Zeitvermittelte 5-LO-Expression in U2OS-Zellen.	83
Abbildung 23. Expressionsanalysen in p53-Wildtyp-exprimierenden Zellen.	85
Abbildung 24. p53-Wildtyp-abhängige <i>ALOX5</i> -Expression in HCT116-Zellen.	87
Abbildung 25. p53-Wildtyp-abhängige Expression in HCT116-Zellen.	88
Abbildung 26. RT-qPCR-Analyse der Expression von <i>ALOX5</i>	90
Abbildung 27. <i>ALOX5</i> -Expression in p53-Knockdown-Zellen.....	92
Abbildung 28. Änderung der Expression p53-regulierter Targetgene in p53-Knockdown-U2OS-Zellen.	93
Abbildung 29. Western Blot Analyse des 5-LO-Proteins in p53-Knockdown-U2OS-Zellen.	94
Abbildung 30. Bestimmung der 5-LO-Produktbildung in Zellhomogenaten.....	95
Abbildung 31. Bestimmung der 12- und 15-LO-Produktbildung in Zellhomogenaten.	96
Abbildung 32. Bestimmung der COX-2-Aktivität in Zellhomogenaten.....	97
Abbildung 33. Induktion des 5-LO-Promotor-IntronG-Konstrukts durch die Überexpression von Wildtyp p53.....	98
Abbildung 34. Lokalisationsassay von 5-LO und p53 in U2OS-Zellen.....	100
Abbildung 35. Kolokalisation von 5-LO und p53 im Nukleus humaner U2OS-Zellen.....	102
Abbildung 36. Aufnahme von optischen Serienschnitten.....	103
Abbildung 37. Co-Immunopräzipitation von p53 und 5-LO.	105
Abbildung 38. Co-Immunopräzipitation von p53 und rekombinanter 5-LO.....	106

Abbildung 39. RT-qPCR-Analyse der Expression von <i>ALOX5</i> in transfizierten U2OS-Zellen.....	108
Abbildung 40. RT-qPCR-Analyse der Expression von Genen die an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind in transfizierten U2OS-Zellen.....	112
Abbildung 41. RT-qPCR-Analyse der Expression apoptotischer Targetgene in transfizierten U2OS-Zellen.....	114
Abbildung 42. RT-qPCR-Analyse der Expression von <i>ALOX5</i> in transfizierten HeLa-Zellen.....	115
Abbildung 43. RT-qPCR-Analyse der Expression p53-regulierter Targetgene in transfizierten HeLa-Zellen.....	118
Abbildung 44. Hemmung der transkriptionellen p53-Enhancer-Aktivität durch überexprimierte 5-LO.....	120
Abbildung 45. RT-qPCR-Analyse - Kontrolle der 5-LO-Knockdown-Effizienz in U2OS-Zellen.....	122
Abbildung 46. RT-qPCR-Analyse - Kontrolle der 5-LO-Knockdown-Effizienz in HCT116-Zellen.....	124
Abbildung 47. RT-qPCR-Analyse p53-regulierter Gene in HCTp53 ^{+/+} und HCT116p53 ^{-/-} -5-LO-Knockdown- Zellen.....	129
Abbildung 49. RT-qPCR- und Western Blot-Analyse von <i>p53</i> in HCT116p53 ^{+/+} -5-LO-Knockdown- Zellen.....	130
Abbildung 50. Einfluss des 5-LO-Knockdowns auf das Wachstum von U2OS-Zellen.....	132
Abbildung 51. Einfluss des 5-LO-Knockdowns auf das Wachstum von HCT116-Zellen....	133
Abbildung 52. Erfassung der frühen Apoptose in 5-LO-Knockdown-Zellen.....	135
Abbildung 53. Konsensussequenzen von klassischen p53-regulierten Targetgenen.....	138
Abbildung 54. „Loop-Hypothese“ der <i>ALOX5</i> -Expression.....	141
Abbildung 55. Vergleich der Konfokalmikroskopiebilder (modifiziert nach Catalano <i>et al.</i> [246]).....	149
Abbildung 56. Induktion der Gene <i>ALOX5</i> und <i>PTGS2</i> durch den Transkriptionsfaktor p53.....	155
Abbildung 57. Mutp53 (GOF) als Aktivator der transkriptionellen Überexpression von <i>ALOX5</i> und <i>PTGS2</i>	156

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	31
Tabelle 2: Verwendete Einwegmaterialien	32
Tabelle 3: Verwendete Geräte	33
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	35
Tabelle 5: Verwendete Beads	35
Tabelle 6: Enzyme und Reagenzien.....	36
Tabelle 7: Primärantikörper	37
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.....	38
Tabelle 9: Verwendete Zellkulturmedien	39
Tabelle 10: Einfriermedium	40
Tabelle 11: Trypanblau-Lösung.....	40
Tabelle 12: Zell-Lyse-Puffer	41
Tabelle 13: SDS-Page Puffer	41
Tabelle 14: Western Blot Puffer	42
Tabelle 15: Sekundärantikörper für den Western Blot	43
Tabelle 16: Zusammensetzung der cDNA Synthese	44
Tabelle 17: PCR Ansatz pro Probe	45
Tabelle 18: Verwendetes PCR Programm.....	45
Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide für die Expressionsanalyse	45
Tabelle 20: ChIP Ansatz pro Probe	47
Tabelle 21: Verwendete ChIP-Primer	49
Tabelle 22: Verwendete ChIP-Puffer	49
Tabelle 23: Oligonukleotidsequenzen.....	50
Tabelle 24: OPDA Puffer	51
Tabelle 25: Immunfluoreszenz Puffer.....	52
Tabelle 26: Immunfluoreszenz Primärantikörper	52
Tabelle 27: Lokalisationsassay Puffer.....	53
Tabelle 28: Verwendete Puffer bei der Co-IP.....	54
Tabelle 29: Puffer für die Transfektion	55
Tabelle 30: Puffer für die AnnexinV/PI-Färbung	56
Tabelle 31: Puffer für den Caspase-3 Assay.....	57
Tabelle 32: Aktivitätsassay-Puffer	58
Tabelle 33: Restriktionsenzyme	59
Tabelle 34: PCR Ansatz pro Probe	59
Tabelle 35: PCR Programm.....	60
Tabelle 36: Nährkulturmedien.....	61
Tabelle 37: Bakterienstämme.....	62
Tabelle 38: Verwendete Plasmide	62
Tabelle 39: Sigma MISSION®-p53-shRNA-Sequenzen	63
Tabelle 40: Sigma MISSION®-5LO-shRNA-Sequenzen.....	64
Tabelle 41: Vergleich der basalen 5-LO-Expression ($2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werte)	143
Tabelle 42: „gain of function“ Mutationen von p53	145

Abkürzungen

-/-	Knockout
AA	Arachidonsäure
Act.D	Actinomycin D
<i>ALOX5</i>	5-LO-Gen
AP-2	Activating Protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-anhängige Kinase
<i>CDKN1A</i>	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
cDNA	komplementär DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CK2	Proteinkinase CK2
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A2
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cyc	Cyclin
cysLT	Cysteinyl-Leukotrien
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Eto	Etoposid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase
GOF	gain of function
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasen

KD	Knockdown
kDA	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LOF	loss of function
LT	Leukotriene
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Mut	Mutiert/Mutation
mutp53	mutiertes p53
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLS	Kernlokalisierungssignal, "nuclear localization signal"
N-Terminus	Amino-Terminus
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandine
PI	Propidiumiodid
Pol II	RNA-Polymerase II
PTM	Posttranslationale Modifikation
RE	Response Element
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative "real time" Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	short-hairpin RNA
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBST	tris buffered saline plus Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TP53	Tumorsuppressor-Gen p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	20 Polyoxeethylen-Sorbitan-Monolaurat
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VDR	Vitamin D3 Rezeptor
w/o	without, ohne
w/v	Masse/Volumen
WT	Wildtyp
wtp53	Wildtyp p53
α	anti
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Pathogenese maligner Tumoren

Unter dem Begriff „Krebs“ versteht man in der medizinischen Onkologie das anormale, neoplastische Wachstumsverhalten (Gewebe Neubildung) eines Gewebes, welches auch fachsprachlich als Tumor bezeichnet wird. Besondere charakteristische Merkmale des neoplastischen Wachstums sind die Autonomien, die es den Tumorzellen erlauben gewebeunabhängig zu proliferieren, Apoptose-Signale zu umgehen, zu infiltrieren oder darüber hinaus zu metastasieren. Neoplasien lassen sich zum einen in benigne (gutartig) und zu anderen in maligne (bösartig) unterscheiden. Gutartig werden Tumore bezeichnet, die autonom wachsen und sich gut vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Im Gegensatz zu bösartigen Tumoren kommt es bei gutartigen Tumoren zu keiner Metastasierung. Maligne invasive Tumorzellen sind zum einen dadurch gekennzeichnet, benachbartes Gewebe zu infiltrieren und zum anderen sich über die Blut- und Lymphbahnen im Körper zu verbreiten (Metastase). Die Problematik anormaler Neoplasien ist die extreme Wandlungsfähigkeit, das Umgehen des Immunsystems durch bestimmte Moleküle auf ihrer Zelloberfläche sowie die Heterogenität der Tumore [1,2]. Ein Beispiel dafür ist die Schnelligkeit Resistenzen gegenüber Chemotherapie zu entwickeln, die eine Behandlung unwirksam macht [3].

Statistisch betrachtet, stehen maligne Tumore nach den kardiovaskulären Erkrankungen an zweiter Stelle (BMBF, Bundesministerium für Bildung und Forschung). Jährlich erkranken zwischen 330.000 und 380.000 Menschen neu, wobei rund 26 % aller im Jahre 2011 verstorbenen Personen (852328) in Deutschland malignen Tumoren erlagen (Statistisches Bundesamt, Stand 4. Februar 2013). Mammakarzinome stellen bei Frauen die häufigste Todesursache dar, gefolgt von Kolonkarzinom und Rektumkarzinom (Abbildung 1). Bei Männern hingegen liegen die Neuerkrankungsraten für Bronchialkarzinom, Prostatakarzinom sowie Kolonkarzinom - und Rektumkarzinom am höchsten (Abbildung 2).

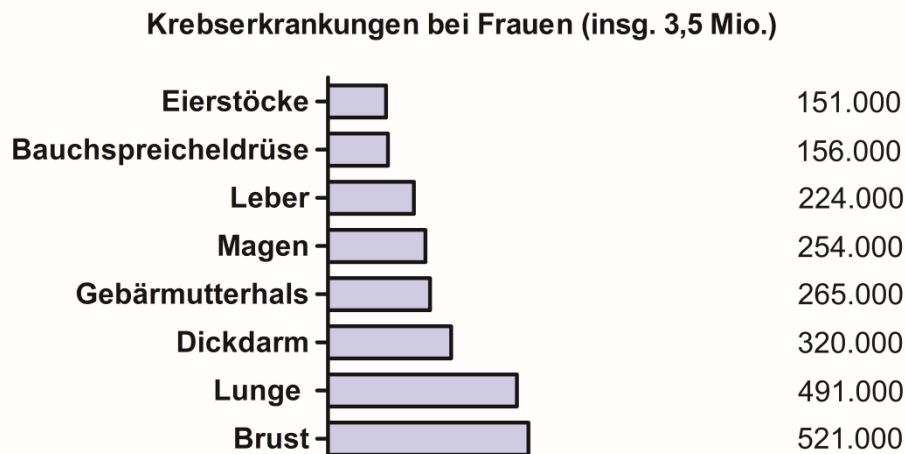


Abbildung 1. Anzahl der Krebserkrankungen bei Frauen.

Zahl der weltweit geschätzten Todesfälle bei weiblichen Tumorerkrankten 2012 hervorgehend aus einer aktuellen Studie der IARC (Internationalen Agentur für Krebsforschung „International Agency for Research on Cancer“, der WHO) [4].

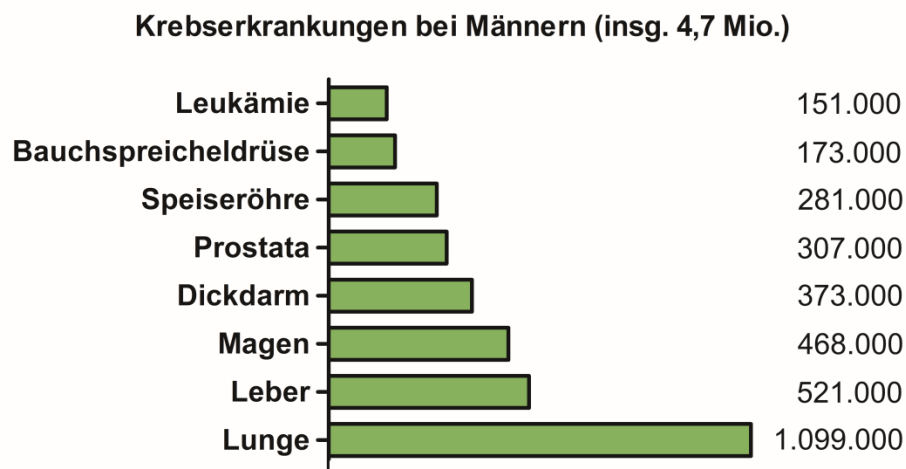


Abbildung 2. Anzahl der Krebserkrankungen bei Männern.

Zahl der weltweit geschätzten Todesfälle bei männlichen Tumorerkrankten 2012 hervorgehend aus einer aktuellen Studie der IARC (Internationalen Agentur für Krebsforschung „International Agency for Research on Cancer“, der WHO) [4].

Bei Kindern sind Malignome (bösartige Tumore) die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken rund 1.750 Kinder unter 15 Jahren an Tumoren wie Leukämie, ZNS-Tumoren oder an Lymphomen (BMBF). Eine frühzeitige Diagnostik spielt eine entscheidende Rolle bei der Rekonvaleszenz der Erkrankten. Je nach Tumorentität

sowie Stadium kommen therapeutischen Möglichkeiten wie Operationen, Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie zum Einsatz. Dabei spielen folgende Aspekte eine entscheidende Rolle: (1) das lokale Ausbreitungsverhalten, (2) das Ausmaß der Differenzierung, (3) die Proliferationsrate sowie (4) das Vorhandensein von Metastasen. Durch die Strahlen- oder Chemotherapie werden DNA-Schäden erzeugt, welche die Expression von Genen induzieren, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind [5,6].

Die Tumorentwicklung (Karzinogenese) ist ein äußerst komplexer Prozess der Krebsentstehung und Gegenstand aktueller Forschung. Dauerhafter intrazellulärer oder extrazellulärer genotoxischer Stress oder Karzinogene können irreversible Mutationen des Genoms initiieren. Ebenso können chronische Entzündungsprozesse eine Tumorpromotion begünstigen. Durch die Veränderungen von spezifischen Gensequenzen, welche für das normale Zellwachstum, die Cytokinese und Differenzierung entscheidend sind, entstehen aus sogenannten Protoonkogenen Onkogene mit neuer karzinogener Eigenschaft. Eines der bestuntersuchtsten Beispiele ist der Tumorsuppressor p53. In nicht-karzinogenen Zellen fungiert p53 als Tumorsuppressor und reguliert eine große Anzahl an Targetgenen der Schadensregulierung oder des programmierten Zelltodes [7-10]. In vielen Tumortypen finden sich dagegen vermehrt mutierte Formen von Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen (wie p53), wodurch die Zellen durch einen Funktionsverlust gekennzeichnet sind [11-13] und es zu einer unkontrollierbaren Zellproliferation kommt.

1.2 Der Tumorsuppressor p53

p53 wurde erstmals 1979 von mehreren Forschergruppen unabhängig voneinander als Interaktionspartner des Onkoproteins large T-antigen (LT) des Simian Virus 40 (SV40) beschrieben [14-17]. Zu Beginn wurde angenommen, dass p53 aufgrund der hohen Proteinlevel und Akkumulation sowohl in SV40 transformierten Zellen als auch in weiteren Tumorzellen, in Abhängigkeit zu dem LT-Protein, stark erhöht ist und somit zu den zellulären Onkogenen gehört [14,18,19]. In den folgenden Jahren konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Protein, nicht wie folglich angenommen um ein Onkogen sondern viel mehr um einen Tumorsuppressor handelt, der den Zellzyklus kontrolliert und die Aktivierung der Apoptose induziert [20]. Das Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für ein 53 kDa schweres Protein. Es besteht aus

393 Aminosäuren und gliedert sich in mehrere Domänen (Abbildung 6) [21–23]. Mehr als die Hälfte aller Tumoren (55%) zeigen Veränderungen in mindestens einem der beiden Allelen des Gens *TP53* (*International Agency for Cancer Research TP53 Mutation Database*). Dazu gehören Krebserkrankungen wie das Li-Fraumeni-Syndrom, das Nebennierenrindenkarzinom oder Speiseröhrenkrebs die auf Mutationen in *TP53* (dem p53-Gen) zurückzuführen sind [24–26].

Dabei gehörten Deletionen und Punktmutationen des humanen p53-Gens zu den häufigsten genetischen Aberrationen in den Tumorzellen [27]. Infolge dieser Mutationen kann es zu einer Expression eines veränderten Proteins mit neuer, onkogener Eigenschaft kommen. Dies wiederum kann zur Folge haben, dass es sowohl zu einem Funktionsverlust („*loss of function*“) als auch zu einem Funktionszugewinn („*gain of function*“) des Wildtyp-p53 Proteins kommen kann [28].

1.3 Regulation der Aktivität von p53

1.3.1 Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus einer Zelle kann in vier definierte Phasen untergliedert werden: G₁-, S-, G₂- und M-Phase. Die Arretierung des Zellzyklus kann an zwei Kontrollpunkten, der G₁/S- und der G₂/M Checkpunkt, durch Komplexe bestehend aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), gesteuert werden (Abbildung 3) [29]. Die Zellzyklus-Kontrollpunkte regulieren wichtige Phasenübergänge und kritische Prozesse, die zum Schutz der Integrität des Erbgutes dienen [30,31]. Zu den bekanntesten p53 Targetgenen im Zellzyklus- und DNA-Reparatur-Signalweg gehören p21^{WAF1/CIP1}, 14-3-3 σ und Gadd45 α [32-34].

Die Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen wird spezifisch durch Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKI) reguliert. Die CKI können in zwei Untereinheiten unterteilt werden. Zum einen ist das die CIP/KIP Familie, die verschiedenen Cyclin/CDK-Komplexe hemmen kann, und zum anderen die INK4-Familie, die spezifisch CDK4/6-Komplexe inhibiert. Komplexe von CDK2 und Cyclin-E können spezifisch durch Cip/Kip CKI Proteine gehemmt werden (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) [30]. Dabei fungiert p21 zum einen als Inhibitor der Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen, durch eine direkte Bindung (Cip1, „CDK-interacting protein 1“) [32] und zum anderen als Vermittler des durch p53 induzierten Wachstumsarrests (WAF1, „*wild-type p53-activated fragment*“) [35]. Die

INK4-Familie (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c und p19INK4d) verhindert durch die Inhibition der CDK4/6-Komplexe die Progression aus der G₁-Phase in die S-Phase, indem sie die Phosphorylierung von Rb (Retinoblastom-Protein) verhindern [36]. Die Phosphorylierung des Proteins wiederum induziert die Dissoziation des E2F-DP-Komplexes (*E2 promoter-binding-protein-dimerization Partners* [E2F-DP]) von pRB was zu einer Aktivierung von Cycline E und A führt. Durch die Bindung erfolgt eine Inhibierung der E2F-Aktivität, wodurch der Komplex wie ein Wachstumssuppressor auf die Zellzyklusprogression wirkt [30,37].

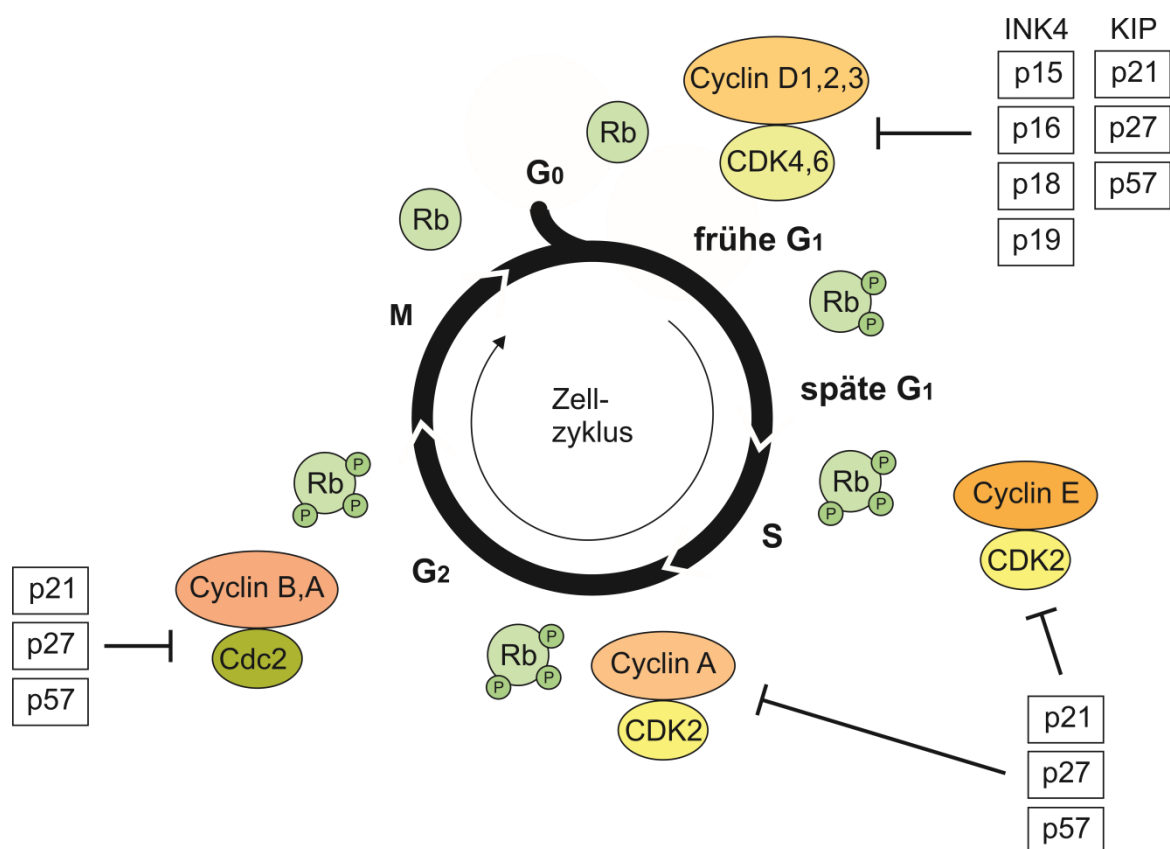


Abbildung 3. Zellzyklusregulation durch Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline.

Dargestellt sind die Kontrollpunkt (checkpoint) des Zellzyklus, Die CDKI der INK4a-Familie hemmen G₁-Phase-Cycline, die der KIP-Familie können auch S- und G₂-Phase Cyclin-CDK-Komplexe hemmen. Modifiziert nach Dr. Katharina Schelwies.

Die G₂/M-Transition wird posttranslational durch Phosphorylierung kontrolliert. Der Komplex aus der aktiven dephosphorylierten CDK Cdc2 und Cyclin B vermittelt den Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus. Ist die Zelle jedoch Einflüssen wie genotoxischer Schäden

ausgesetzt, erfolgt eine vorgeschaltete Aktivierung der ATM und ATR-Kinasen, die daraufhin die CDK1 und CDK2 Kinasen phosphorylieren und dadurch aktivieren [30,31]. Die Aktivierung von CDK1 und CDK2 führen zu einem Phosphotransfer auf die Phosphatase Cdc25 und damit zu einer Inhibierung des Enzyms. Cdc25 bindet im phosphorylierten Zustand an 14-3-3 σ und wird nach Ubiquitinylierung über das Proteasom abgebaut. Hierdurch wird die Dephosphorylierung von Cdc2 gehemmt und G₂-Arrest ausgelöst [31].

1.3.2 Induktion von Apoptose

Können die durch Stress verursachten Schäden nicht repariert werden, kann die Zelle durch spezielle Signalwege den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Im Gegensatz zur Nekrose, welche durch den passiven Zelltod charakterisiert wird, ist die Apoptose ein physiologischer und phylogenetisch konservierter Prozess, den die Zelle selbst initiiert [6,38,39]. Die Induktion der Apoptose kann sowohl auf dem extrinsischen (externen Stimulus) als auch auf dem intrinsischen (interner Stimulus) Weg erfolgen (Abbildung 4) [6].

Die Aktivierung des extrinsischen Weges erfolgt über ligandenaktivierte Zelloberflächenrezeptoren, sogenannten Todesrezeptoren [40]. Zu den p53-Targetgenen des extrinsischen Weges gehören die Gene *CD95/Fas* und *KILLER/DR5* (TNFR-Familie), die für Todesrezeptoren kodieren [6,41]. Die Ligandenbindung an einen Todesrezeptor ruft dessen Trimerisierung hervor und die zytoplasmatische Todesdomäne (*death domain*) ist nun in der Lage Adaptermoleküle zu binden [42]. Durch die Aktivierung der Rezeptoren kommt es zu einer Caspasen-Kaskade, die ein Freisetzen von Cytochrom C aus dem Mitochondrium bewirken [43]. Bei dem zweiten Weg der Apoptoseinduktion, dem intrinsischen Weg, erfolgt die Aktivierung der Apoptose durch die transkriptionelle Regulation von pro-apoptotischen Targetgenen durch p53. Zu den bekanntesten intrinsischen Targetgenen gehören die pro-apoptotischen Proteine Bax, BAD, PUMA und NOXA [27,44]. DNA-Schäden haben zur Folge, dass das pro-apoptotische Protein Bax exprimiert wird und es zu einer Freisetzung des Cytochrom C kommt. Freigesetztes Cytochrom C oligomerisiert mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) und der Procaspase-9 zum so genannten Apoptosom [45]. Die Aktivierung der Caspase-9 induziert eine Caspase-Kaskade und der Prozess der Apoptose wird initiiert. Neben der transkriptionellen Regulation der Targetgene kann p53 direkt mit den Proteinen der

Bcl-Familie (*B-cell lymphoma protein 2*) interagieren und damit die Aktivierung pro-apoptotischer Targetgene induzieren [46,47].

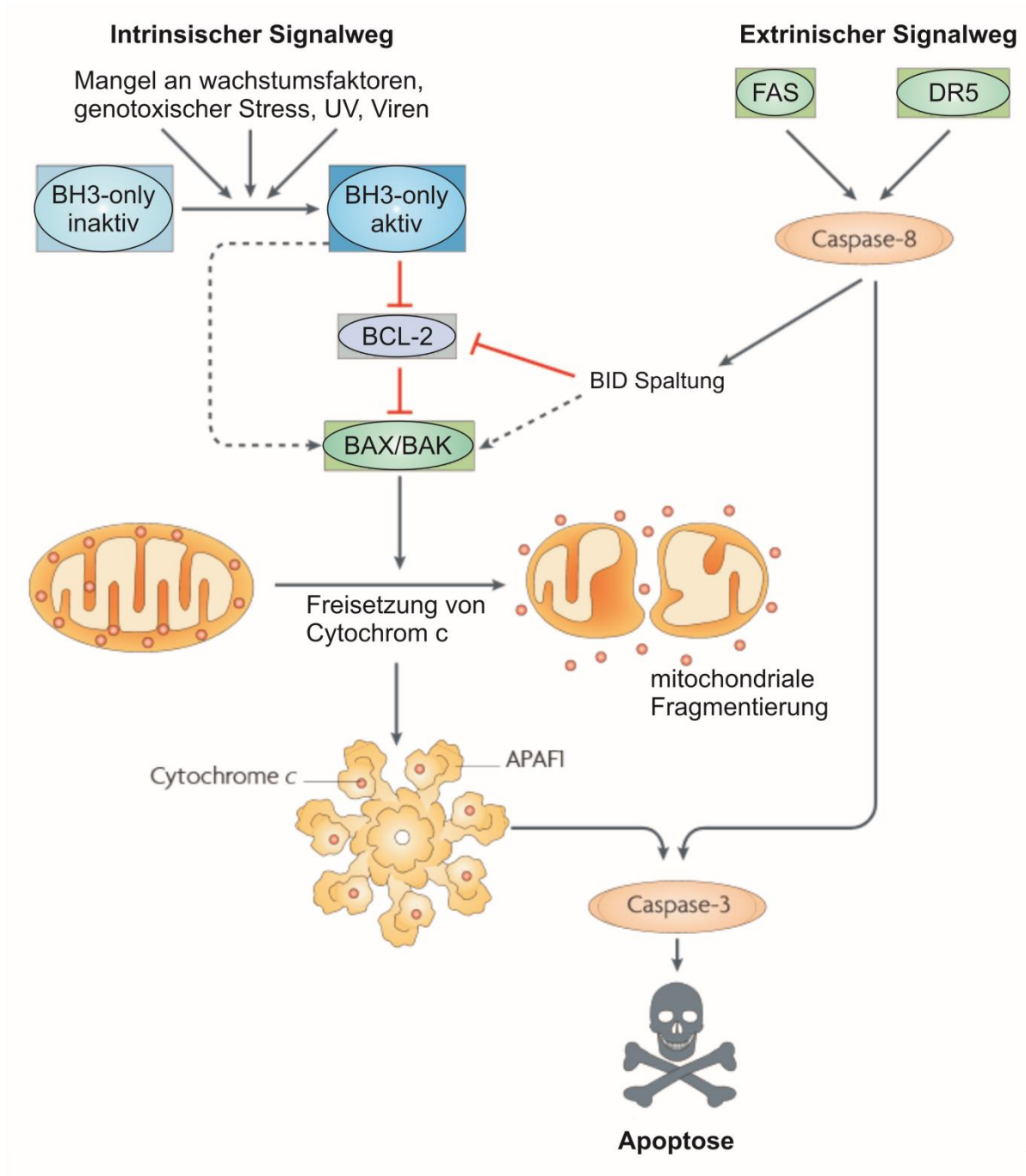


Abbildung 4. Apoptose-Signalweg.

Intrinsischer Signalweg: Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade über die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine BAX/BAK. Extrinsischer Signalweg: Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalweg mit dem mitochondrialen Signalweg. Modifiziert nach Youle und Strasser [48].

1.3.3 Negative Regulation von p53 durch MDM2

Das Protoonkogen MDM2 (*murine double minute gen2*) oder HDM2 (*human double minute gen2*) gehört zu der Familie der Ring-Finger-Proteine und ist einer der essenziell wichtigsten negativen Regulatoren des Transkriptionsfaktors p53. Um die konstitutive Expression von p53 zu regulieren, liegt der Transkriptionsfaktor p53 in Abwesenheit von Stresssignalen gebunden mit dem Onkoprotein Mdm2 vor [49]. Mdm2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase die durch Ubiquitinierung der sechs C-terminalen Lysine (Lys370, 372, 373, 381, 382 und 386) die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von p53 blockiert und eine Proteasom-vermittelte Degradierung induziert [50,51]. Auf Aktivitätsebene reguliert Mdm2 den Transkriptionsfaktor p53, wohingegen p53 MDM2 auf Transkriptionsebene reguliert. Dieser negative autoregulatorische Rückkopplungsmechanismus „*negative feedback loop*“ sowie die essentielle Bedeutung des Mdm2-Proteins konnte in Knockout-Mausmodellen demonstriert werden. Eine MDM2-Defizienz führt zu einer frühen embryonalen Letalität, die jedoch durch einen gleichzeitigen Knockout von p53 aufgehoben wird. Der Verlust von MDM2 führt allerdings nicht zu einer uneingeschränkten Aufhebung der Degradation [52], da gezeigt werden konnte, dass zusätzliche E3-Ubiquitin-Ligasen wie COP1, PIRH2 oder Mdmx (Mdm4) ebenso eine entscheidende Rolle bei der Regulation spielen [53,54]. Infolge von Stresssignalen wie zum Beispiel durch DNA-Schäden wird der autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus unterbrochen, sodass p53 unterstützt durch PTM seine Funktionen als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor voll entfalten kann.

1.3.4 Einleitung der zellulären Stressantwort durch p53

In intakten, unstimulierten Zellen ist die Konzentration an p53 gleichbleibend gering. Ist die Zelle jedoch Einflüssen, wie oxidativem Stress, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, Hypoxie, DNA-Schäden oder fehlerhafter Zellteilung ausgesetzt, kommt es zu einer Aktivierung, Stabilisierung und Akkumulierung von p53 [55–58]. DNA-Schäden z.B. infolge von Chemotherapeutika aktivieren eine p53-vermittelte Stressantwort [59]. Dadurch wird in Tumorzellen ein transients Zellzyklusarrest induziert, wodurch spezifische DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden können [31]. Bei schwerer Schädigung der Zelle kommt es hingegen zu einer Aktivierung eines terminalen Zellzyklusarrests mit zusätzlicher Einleitung der prämaternen Seneszenz [60] oder dem

programmierten Zelltod (Apoptose) [61,62]. Die Apoptose nimmt hierbei eine essentielle Rolle zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod in Gewebe und Organen ein [63].

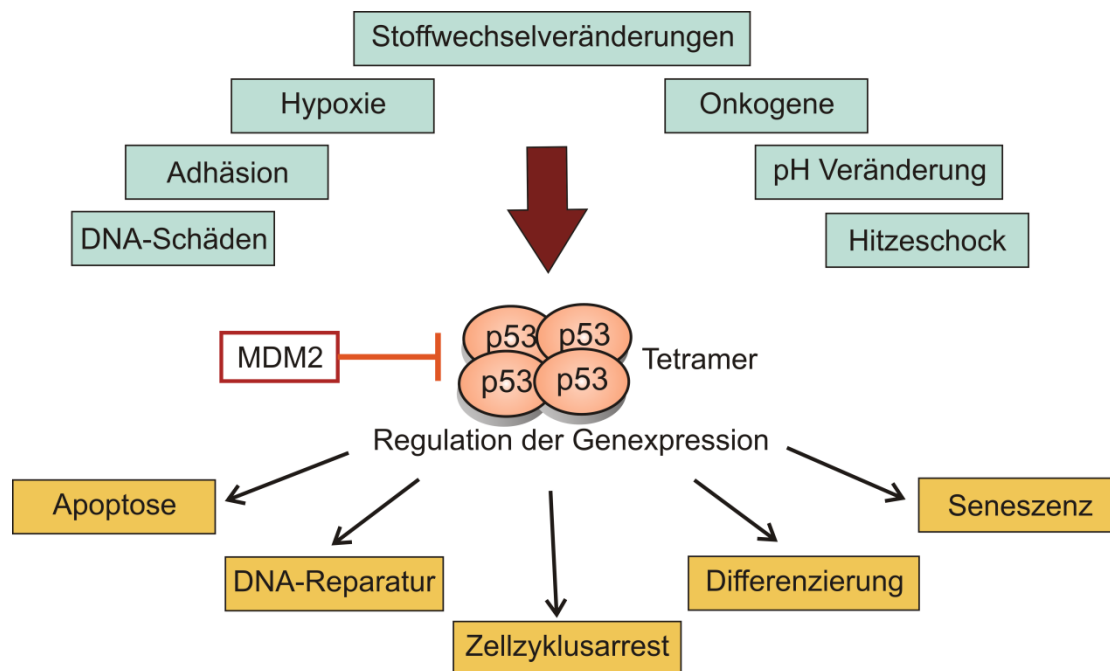


Abbildung 5. Möglichkeiten der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress.

Induktion des Tumorsuppressors p53 nach einwirken verschiedener Stress-Stimuli (DNA-Schäden, Adhäsion, Hypoxie usw.). p53 bindet als Tetramer an die spezifischen Sequenzen der Targetgene. Mdm2 ist ein wichtiger Regulator des Tumorsuppressorgens p53; Mdm2 ubiquitiniert p53 und bewirkt dadurch den proteasomalen Abbau. Je nach Ausmaß der Schädigung aktiviert p53 entsprechende Targetgene für eine zelluläre Antwort (Zellzyklusarrest verbunden mit DNA-Reparatur) oder bei irreparablen Schäden Apoptose. p53 kann ebenfalls die Regulation der Genexpression von Targetgenen die zur Differenzierung oder Seneszenz der Zelle führen aktivieren.

1.3.4 Proteinstruktur von p53

Das p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und kann strukturell sowie funktionell in unterschiedliche Domänen unterteilt werden (Abbildung 6) [64]. Die erste Domäne, die Transkriptionsaktivierungs-Domäne, gliedert sich in zwei Unterdomänen TAD1 (AS1-40) und TAD2 (41-61) [65]. An diese Sequenz können Interaktionspartner, wie transkriptionelle Ko-Aktivatoren oder negativen Regulatoren wie Mdm2/Mdmx binden [66–68].

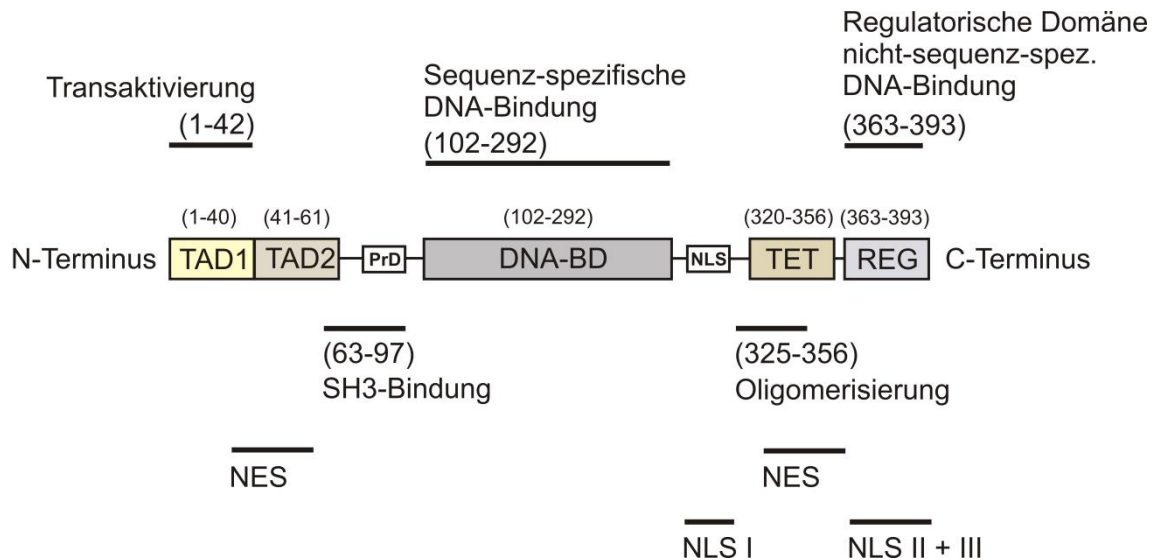


Abbildung 6. Struktureller Proteinaufbau von p53.

Dargestellt ist die Domänenstruktur von p53. Das Protein setzt sich aus 393 AS zusammen; die eingeklammerten Zahlen beziehen sich jeweils auf die AS-Position der jeweiligen Domänen. TAD = Transaktivierungsdomäne, PrD = Prolin-reiche Domäne, DNA-BD = DNA-Bindedomäne, NLS = Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localization Signal*), TET = Tetramerisierung verantwortliche Sequenz, REG = C-terminale regulatorische Domäne, NES = nukleäre Exportsequenz.

Die zweite Domäne, die Prolin-reiche Domäne, liegt im N-terminalen Bereich (AS 63-97) und besteht aus fünf Wiederholungen des Motivs PXXP (P = Prolin, X = beliebige AS) [69]. Die genaue Bedeutung der Polyprolin-Domäne in der Regulation und Funktion von p53 ist nach wie vor unklar. Die zentrale Bindedomäne (AS 102-292) vermittelt die sequenzspezifische Bindung von p53 an die DNA [70]. p53 bindet als Tetramer an die spezifischen Sequenzen wodurch es zu einer Verdrehung der Doppelhelix kommt [71]. Diese Region nimmt eine räumliche, antiparallele „ β -Sandwich“-Struktur ein die durch Zn^{2+} stabilisiert wird und dadurch eine sequenzspezifische Bindung mit der DNA über ein „*loop-sheet-helix*“-Motiv herstellen kann [72]. Die spezifische Bindung erfolgt, wie bereits erwähnt, über die doppelsträngige p53-Erkennungssequenz (*p53 response element*, p53-RE), die sich aus zwei Halbseiten der palindromischen Dekamer-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R = Purin, W = A oder T und Y = Pyrimidin) zusammensetzt [73]. Die DNA-BD ist über einen flexiblen Linker, der die NLS beinhaltet, mit der Tetramerisierungsdomäne (AS 325 - 356) verbunden. Diese Domäne wurde mittels NMR charakterisiert [74,75]. und besteht aus einem β -Strang, das durch einen Linker mit einer α -Helix verbunden ist [64]. Durch das Aneinanderlagern zweier identischer Untereinheiten kommt es zur Bildung eines Dimers, welches wiederum durch hydrophobe

Wechselwirkungen ein Tetramer bilden kann [72]. Vor und innerhalb der TET befinden sich außerdem drei nukleäre Lokalisationssignale NLS I, II und III (AS 303-323), die die Translokation von p53 aus dem Zytoplasma in den Nukleus vermitteln [19].

Des Weiteren befindet sich in der Mdm2-Bindedomäne sowie in im C-Terminus [19] ein nukleäres Export-Signal (NES), welches von dem Exportprotein CRM1 gebunden wird und p53 durch die Kernmembran ins Zytoplasma transloziert, um dort vom Proteasom abgebaut zu werden [53]. Durch posttranslationale Modifikationen wird die NES blockiert und p53 bleibt im Zellkern. An der Carboxyterminalen Bindungsdomäne (AS363 – 393) befindet sich eine weitere DNA-Binderegion durch die p53 auch an sequenzunabhängige DNA binden kann [76]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen des C-Terminus, wie Acetylierung durch CBP/p300 oder PCAF [77–79], eine essenzielle Rolle bei der sequenzspezifischen Bindung an die DNA und somit einen regulatorischen Einfluss auf die zentrale DNA-Bindedomäne haben [80,81].

1.3.5 Stabilisierung und Aktivierung von p53 durch Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen stellen eine der wichtigsten Veränderungen eines Proteins dar [82]. Die Aktivität eines Proteins kann dadurch reversibel beeinflusst werden. Das Protein p53 kann nach der Translation mehr als 50 Mal durch verschiedenen individuelle posttranslationale Modifikationen (PTMs) verändert werden [83]. Eine Reihe an PTMs wie Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierungen, Sumoylierung, Methylierungen oder Ubiquitinierungen können zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 als Antwort auf genotoxischen Stress führen [83,84]. Diese Diversität an PTMs ermöglicht die individuelle Regulation verschiedener Targetgene der unterschiedlichen Signalkaskaden [85]. Eine der am besten untersuchtesten Modifikationen ist die Phosphorylierung, die sich hauptsächlich innerhalb der C- und N-Termini befindet. Die Phosphorylierung erfolgt über mehrere Kinasen wie ATM, ATR, p38, Chk1 und Chk2. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungen nahe des N-Terminus, an Serin 15, eine Bindung von Mdm2 unterbinden [86]. Ebenso führt die Acetylierung von p53 zu einer erhöhten Aktivierung und Stabilisierung des Proteins [84]. p53 kann an verschiedenen Lysinresten durch die Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) wie p300 oder Tip60 acetyliert werden [77,87]. Da die meisten Modifikationen reversibel ablaufen, kann

das Protein ebenfalls über Deacetylierung durch die Komplexe HDAC1, SIRT1 oder SIRT2 α reguliert werden [88,89]. Methylierungen und Demethylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit diversen Interaktionspartnern und Koaktivatoren für die Regulierung von Apoptose [90]. Die Regulierung von p53 durch PTMs ist ein komplexer Prozess, der weiterhin Gegenstand aktueller Forschung ist. Die Tatsache, dass verschiedene Reste mehrfach modifiziert werden können, komplettiert die Komplexität der Proteinregulation [91].

1.3.6 Posttranslationale Modifikationen von p53 und deren Einfluss auf die selektive Targetgenregulierung

PTMs spielen neben der Aktivierung und Stabilisierung von p53 eine entscheidende Rolle bei der Selektion von Targetgenen [85,92,93]. Phosphorylierung von Serin 46 (S46) durch die Kinasen HIPK2 [94] oder DYRK2 [95] beeinflusst die Induktion von apoptotischen Targetgenen wie p53AIP1 (*p53 apoptosis inducing protein 1*) bei DNA-Schäden [96,97]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch HIPK2 essentiell für die nachgeschaltete Acetylierung von Lysin 382 ist. Beide modifizierten Reste tragen zur transkriptionellen Regulation apoptotischer Targetgene maßgeblich bei [94][98]. Phosphoryliertes S46 induziert die Acetylierung des Lysinrestes 382 [98]. Serin 46 kann durch mehrere Kinasen wie DYRK2, HIPK2, Proteinkinase C δ [99], AMPK α [100] oder p38 MAPK [101] phosphoryliert werden, was die Bedeutung des Proteinrestes dokumentiert. Die Acetylierung (p300/CBP assoziierte Faktor [PCAF]) [78,102] und Ubiquitinierung (E3-Ligase E4F1) [103] von Lysin 320 (K320) führt hingegen zu einer erhöhten DNA-Bindung an das Targetgen p21 und induziert einen Zellzyklusarrest nach DNA-Schädigung [104].

1.3.7 Sequenzspezifische Bindung von p53 an Response-Elemente

Die Identifizierung von p53 als sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor und die Charakterisierung eines Konsensusbindemotivs [73], ermöglichte die Quantifizierung der Bindestellen von p53 an p53-Targetgene *in vitro* und *in vivo*. Mit Hilfe der Methoden ChIP, ChIP-Sequenzierung, Microarray, ChIP-on-Chip sowie weiterer Sequenzierungstechnologien konnten die Bindestellen von p53 genauestens untersucht und vorhergesagt

werden (Abbildung 7) [105–108]. Das p53 Konsensusbindemotiv setzt sich aus zwei Halbseiten der palindromischen Dekamer-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R = Purin, W = A oder T und Y = Pyrimidin) zusammen, die durch 0-13 bzw. 18 Basenpaare (Spacer) separiert sein können [73][109]. p53 bindet als Dimer an die palindromische Sequenz, wobei jede p53 Untereinheit mit jeweils drei Nukleotiden der RRRCW oder WGYYY Sequenz interagiert. Dies führt wiederum zur einer gegenseitigen Konformationsänderung zwischen Protein und Ziel-DNA [110]. Häufig sind innerhalb einer Gensequenz mehrere p53-REs zu finden die zu einer additiven p53-Antwort beitragen. Ein Beispiel dafür liefert das p53-Targetgen *CDKN1A* (p21) in dem mehrere REs nachgewiesen wurden [111]. Interessanterweise scheint die Affinität von p53 mit der Anzahl der Halbseiten im Bindemotiv linear zu steigen [112]. Einige p53-REs bilden sogenannte „cluster“ die einen positiven Effekt auf die Trans-Aktivierung ausüben [112]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zu einer Interaktion zwischen zwei Dimeren kommen kann und p53 somit als Tetramer die Transkriptions-Maschinerie stark beeinflusst und reguliert [113]. Auch die Anzahl der Spacer-Nukleotide (SpN), in der Regel weniger als drei SpN zwischen den jeweiligen Bindemotiven, kann die Bindung von p53 stark beeinflussen [107,114]. Durch die stark konservierte Konsensussequenz kann es bei Deletionen oder anderen Abweichungen zu einem erhöhten Verlust der Bindung zwischen p53 und der Sequenz und somit zum Verlust der Transaktivierung kommen [115]. Die höchste Transaktivierungskapazität hat die Kernsequenz CATG (im Gegensatz zu CAAG, CTAG oder CTTG) welche eine starke Krümmung bzw. flexible räumliche Orientierung der DNA erlaubt [116,117]. Die erhöhte Flexibilität der Bindeaffinität zur Bindesequenz ermöglicht die Ausbildung von *stem-loop*-Strukturen, welche eine Interaktion mit *cis*-Elementen (Enhancer oder Silencer) ermöglichen [80]. Somit können Enhancer oder Silencer welche vor (*upstream*) oder hinter (*downstream*) dem Promotor liegen, durch die dreidimensionale Struktur der DNA in die räumliche Nähe der Promotorsequenz gebracht werden [118,119]. Es wird postuliert, dass die Anordnung von p53 als Tetramer die DNA Bindung verstärkt und durch die räumliche Orientierung die Interaktion mit der Transkriptions-Maschinerie begünstigt [120,121].

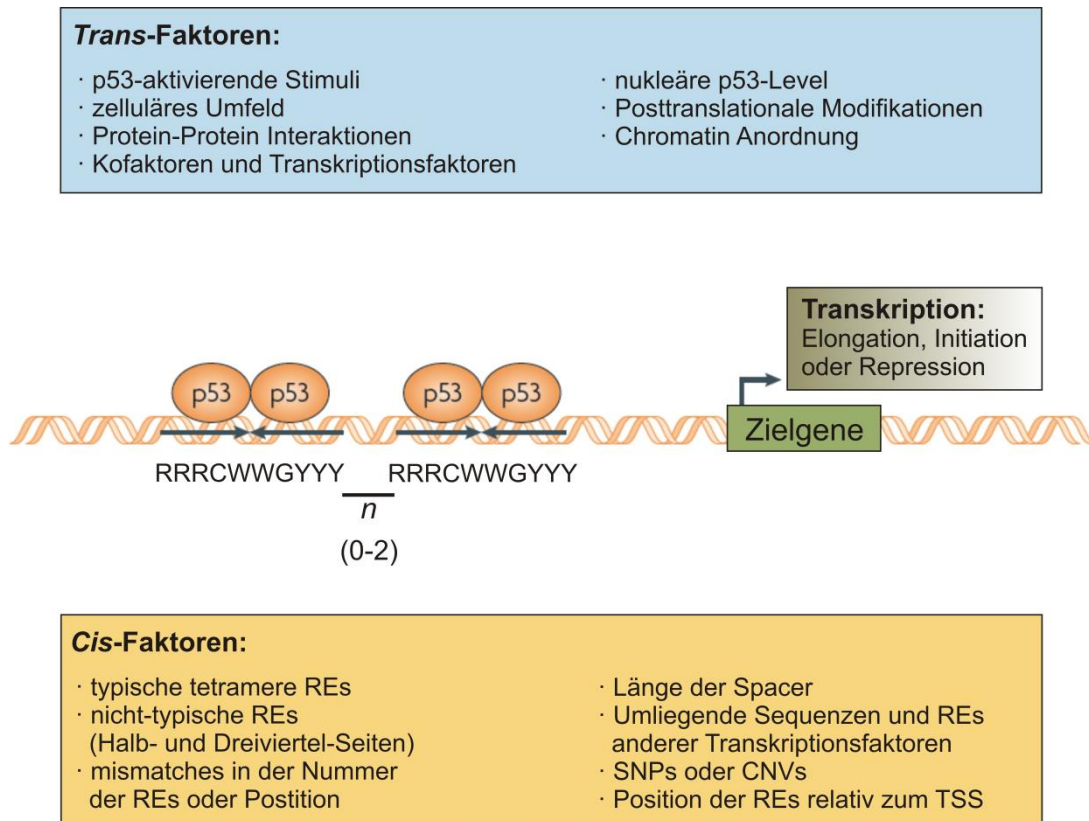


Abbildung 7. Einfluss von *Trans*- und *Cis*-Faktoren auf die transkriptionelle Aktivität von p53.

Darstellung einer p53-Konsensussequenz von zwei Halbseiten der palindromischen Dekamer-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3'(R = Purin, W = A oder T und Y = Pyrimidin) im Zusammenhang mit der Beeinflussung durch *Trans*- sowie *Cis*-Faktoren SNP = single nucleotide polymorphism, CNV = copy number variant; TSS = Transkriptionsstart (modifiziert nach Mendendez [122]).

1.4 Mutationen

Wie bereits erwähnt, nimmt der Tumorsuppressor p53 eine zentrale Schlüsselrolle bei der Regulierung der Schadenssignalwege ein [27]. Das Tumorsuppressorgen ist mit etwa 50% das am häufigsten mutierte Gen in humanen Tumoren. Neben Deletionen, Insertionen und Rekombinationen, nehmen insbesondere monoallelische „*missense*“ Punktmutationen den höchsten Anteil an Mutationen ein (74%). 30% der *missense* Mutationen, sogenannte hotspots, liegen vorwiegend in der DNA-Bindedomäne an den Positionen R175, G245, R248, R249, R273 und R282 (Abbildung 8) [113].

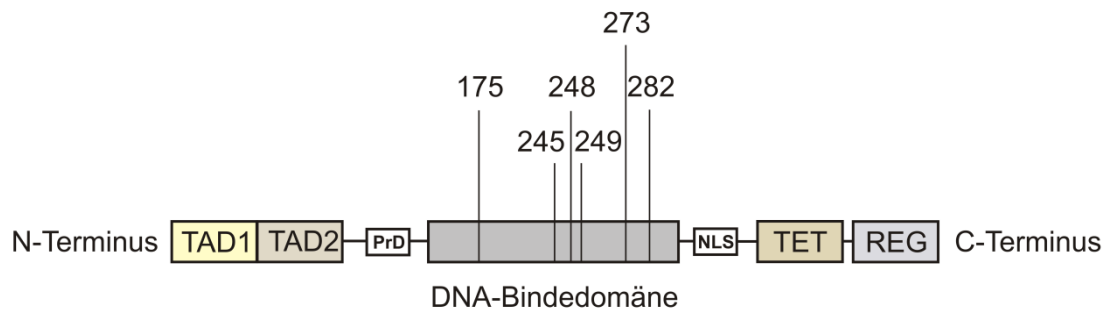


Abbildung 8. Hotspot-Mutationen von p53.

Dargestellt sind die Hotspot-Mutationen in der DNA-Bindedomäne an den Positionen R175, G245, R248, R249, R273 und R282.

Der genetisch veränderte Austausch dieser Aminosäuren führt insbesondere bei den Positionen R248 und R273 zu einem Verlust der sequenzspezifischen Bindung an das p53-RE wodurch Targetgene nicht mehr transkriptionell reguliert werden können. Dies hat zur Folge, dass tumorsupprimierende Funktionen verloren gehen. Die Mutationen an den Positionen R175, G245, R249 und R282 bewirken eine veränderte Konformation des Proteins [123,124]. Durch die heterogene Tetramerisierung des Proteins (wtp53-Allel sowie p53-mutiertes Allel) kommt es zu einer antagonisierenden Funktion des wtp53 durch mutiertes p53. Hierbei spricht man von einem dominant-negativen Effekt [125]. Mutationen im p53 Gen können zu einem Verlust der typischen p53-Funktion führen und werden als *loss-of-function*-Phänotyp bezeichnet. Nicht alle Mutationen führen zu einem Funktionsverlust, Missensmutationen können ebenso zu einem Erwerb von neuen onkogenen Eigenschaften führen, dem *gain of function*-Phänotyp (GOF) [28,123–127]. Trotz Verlustes der sequenzspezifischen DNA-Bindung charakterisiert sich dieser Phänotyp durch gesteigerte Proliferationsrate, Reduktion von Apoptose sowie Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika [123]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass GOF-Mutationen die Expression verschiedener Gene wie *MDR1* [128], *c-MYC* [129], *CD95* (Fas/APO-1) [130] oder *EGR1* [131] transkriptionell beeinflussen können. Neben der charakterisierten Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren p63 und p73 mit dem mutierten p53 konnten weitere Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und ETS1 identifiziert werden [123]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl wtp53 als auch mutp53 an die Faktoren binden, jedoch wtp53 diese reprimiert, wohingegen mutp53 zu einer Induktion der transkriptionellen Aktivität führt. Der Transkriptionsfaktor NF-Y, welcher an das Bindemotiv CCAAT binden kann und Zellzyklus assoziierte Gene reguliert, kann von mutp53 gebunden werden, was zu einer Zunahme der Genexpression beiträgt

[123]. Zudem konnte eine verstärkte Bindung an die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und an den Vitamin D3-Rezeptor beobachtet werden. Die Behandlung mit Vitamin D3, die in wtp53 exprimierenden Zellen Apoptose induziert, führt in mtp53-exprimierenden Zellen zum Überleben [132]. Die Interaktion von mutp53 und NF- κ B führt zu einer Aktivierung des pro-inflammatorischen Signalwegs, dass zur Förderung von malignen Tumoren auf der Basis einer chronischen Entzündung beruht [123].

1.5 Die humane 5-Lipoxygenase (5-LO)

1.5.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LO) gehören zu der Gruppe der nicht-Häm-eisenhaltigen Dioxygenasen, welche die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Dabei erfolgt der Einbau der zwei Sauerstoffatome stereospezifisch an der *cis,cis*-1,4-Pentadienstruktur der Fettsäure. Das menschliche Genom enthält 6 unterschiedliche funktionsfähige LOX-Gene (*ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX5*, *ALOXe3*), die für 6 verschiedene humane LOX-Isoformen die beispielsweise für die 5-LO, 8-LO, 12-LO und die 15-LO kodieren. Die Namensgebung der Lipoxygenasen erfolgt dabei nach der C-Position an dem der Sauerstoff eingebaut wird. In Säugetieren stellt die Arachidonsäure (AA) das Hauptsubstrat der Lipoxygenasen dar, wohingegen in pflanzlichen Zellen vorwiegend Linolsäure und Linolensäure umgesetzt werden. Die erste Identifizierung und Isolierung einer Lipoxygenase gelang im Jahre 1947 (15-LO aus Sojabohnen). Im Jahr 1974 folgte die Entdeckung der humanen 12-LO in Thrombozyten und kurz danach die der 5-LO aus PMNL. Erst Jahre später (2011) gelang es zum ersten Mal die Kristallstruktur der humanen 5-LO zu charakterisieren. Die Expression der 5-LO erfolgt vorwiegend in Zellen myeloiden Ursprungs, wie Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, Monozyten sowie in B-Lymphozyten. Erythrozyten und Thrombozyten sind hingegen 5-LO-negativ [133,134].

1.5.2 Biosynthese und Physiologie der Leukotriene

In Folge proinflammatorischer Stimuli wird Arachidonsäure (AA) durch die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA₂) aus der Kernmembran freigesetzt. Die humane 5-LO katalysiert mit Hilfe des FLAP-Proteins (Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) in einer zweistufigen Redoxreaktion, die Bildung von Leukotrien A₄ (LTA₄) aus AA. Im ersten Schritt wird die AA zu 5(S)-Hydro(pero)xy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-H(p)ETE) oxidiert und im zweiten Schritt zum korrespondierenden Alkohol 5-HETE reduziert oder zu Leukotrien A₄ (LTA₄) konvertiert [135–137]. Das Vorläufermolekül LTA₄ kann, je nach Enzymausstattung der Zelle, durch die Leukotrien A₄-Hydrolase zum Leukotrien B₄ hydrolysiert oder durch die Leukotrien C₄-Synthase, über Konjugation mit Glutathion, zum (Cysteinyl-) Leukotrien C₄ (LTC₄) umgewandelt werden. LTC₄ kann in einem weiteren Metabolisierungsschritt zu (Cysteinyl-) Leukotrien D₄ (LTD₄) und E₄ (LTE₄) umgesetzt werden [135,137].

Leukotriene stellen hochwirksame Lipidmediatoren dar. Sie haben wichtige Funktionen im Rahmen der Immunantwort sowie in der Entstehung allergischer Reaktionen. Sie sind an der Pathogenese einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Gicht, Psoriasis oder Asthma bronchiale beteiligt [126]. LTB₄ selbst fungiert als hochpotentes Chemotaktikum für Eosinophile, Neutrophile und Monozyten. Es fördert dadurch die Rekrutierung, Migration und Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [138,139]. Weiterhin stimuliert LTB₄ die Degranulierung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die vermehrte Bildung und Freisetzung von Zytokinen [140,141]. Bei T-Lymphozyten führt LTB₄ zu einer Steigerung der Zytotoxizität und einer erhöhten Zytokinfreisetzung (IL-5, IL-6, IL-8), wohingegen die Stimulation bei B-Lymphozyten zu einer vermehrten Sekretion von Immunglobulin E (IgE) führt [141,142]. Für die Cysteinyl-Leukotriene (C₄, D₄, E₄) sind vor allem starke bronchokonstriktorische Effekte beschrieben. Zudem haben sie Einfluss auf die Rekrutierung proinflammatorischer Zellen und können die Kapillarpermeabilität steigern. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale ein [143,144].

Experimente zur Hemmung der Leukotrienbiosynthese konnten zeigen, dass die 5-LO eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen einnimmt. Daten zu 5-LO Knockout Mäusen zeigten keine phänotypischen Veränderungen der Tiere in ihrer Entwicklung sowie Lebenserwartung, im Vergleich zu den WT-Mäusen [145]. Auffällig jedoch waren die geringere Fähigkeit der Tiere, entzündliche Erkrankungen auszubilden, die Resistenz gegenüber PAF-induzierter Anaphylaxie sowie die Reduktion von Eosinophilen bei allergischen Entzündungen des Bronchialsystems [146–148]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die 5-LO und deren Metaboliten, neben ihren Effekten im Entzündungsgeschehen, auch in der Genese verschiedener Tumoren beteiligt sind [149].

1.5.3 Von der chronischen Entzündung zur Krebsentstehung - die mögliche Funktion der 5-LO und der Eicosanoide in der Tumorgenese

Häufig sind chronisch entzündliche Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, mit einem erhöhten Risiko verbunden, an Krebs zu erkranken [150]. Rund 20% der Tumorerkrankungen basieren auf chronischen Entzündungen [151]. Interessanterweise beschreibt eine Vielzahl von Studien eine Überexpression der Proteine 5-LO, FLAP und COX-2 in den betroffenen Tumorgeweben [152]. Dies geht oftmals mit erhöhten Eicosanoidspiegeln einher [137,153–155]. Für verschiedene 5-LO-Metabolite konnten z.B. proliferierende und anti-apoptotische Effekte nachgewiesen werden [152,156–158]. Diese Beobachtungen ließen sich durch die Verwendung von 5-LO-Inhibitoren in der Zellkultur z.T. umkehren [152,159–161]. Im Falle einer chronischen Entzündung sind die Level von Prostaglandinen, Leukotrienen und auch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dauerhaft stark erhöht. In Folge dessen, kommt es zur Schädigung von Epithelzellen, welche wiederum ebenfalls vermehrt pro-inflammatorische Eicosanoidmetabolite freisetzen. Dadurch werden erneut Immunzellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, in das entzündliche Gewebe rekrutiert und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, angiogenetischen Faktoren und pro-inflammatorischen Mediatoren (LTB₄ und PGE₂), stimuliert [149,150]. Die Lipidmediatoren PGE₂ und auch LTB₄ können nun, neben ihrer immunmodulierenden Funktion, das Entstehen von Tumoren begünstigen [162]. Für LTB₄ ist bekannt, dass es die Expression von NF-κB in Leberkarzinomzellen erhöht [163]. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Bedeutung von NF-κB für die Tumorgenese [164].

Zudem wirkt die transgene Überexpression der COX-2 und der daraus resultierende Anstieg von PGE₂ tumorpromovierend. Durch die Bindung an die EP1-4 Rezeptoren kommt es zur Inhibition der Kinase GSK3 β . Daraufhin wird β -Catenin aufgrund abnehmender Phosphorylierung vermindert abgebaut und kann im Zellkern akkumulieren. Dies führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der betroffenen Zellen. Die eben erläuterten biologischen Zusammenhänge beschreiben das zirkulatorische Zusammenspiel zwischen entzündlichem Gewebe, Immunzellen und der Tumorgenese (Abbildung 9) [150,165].

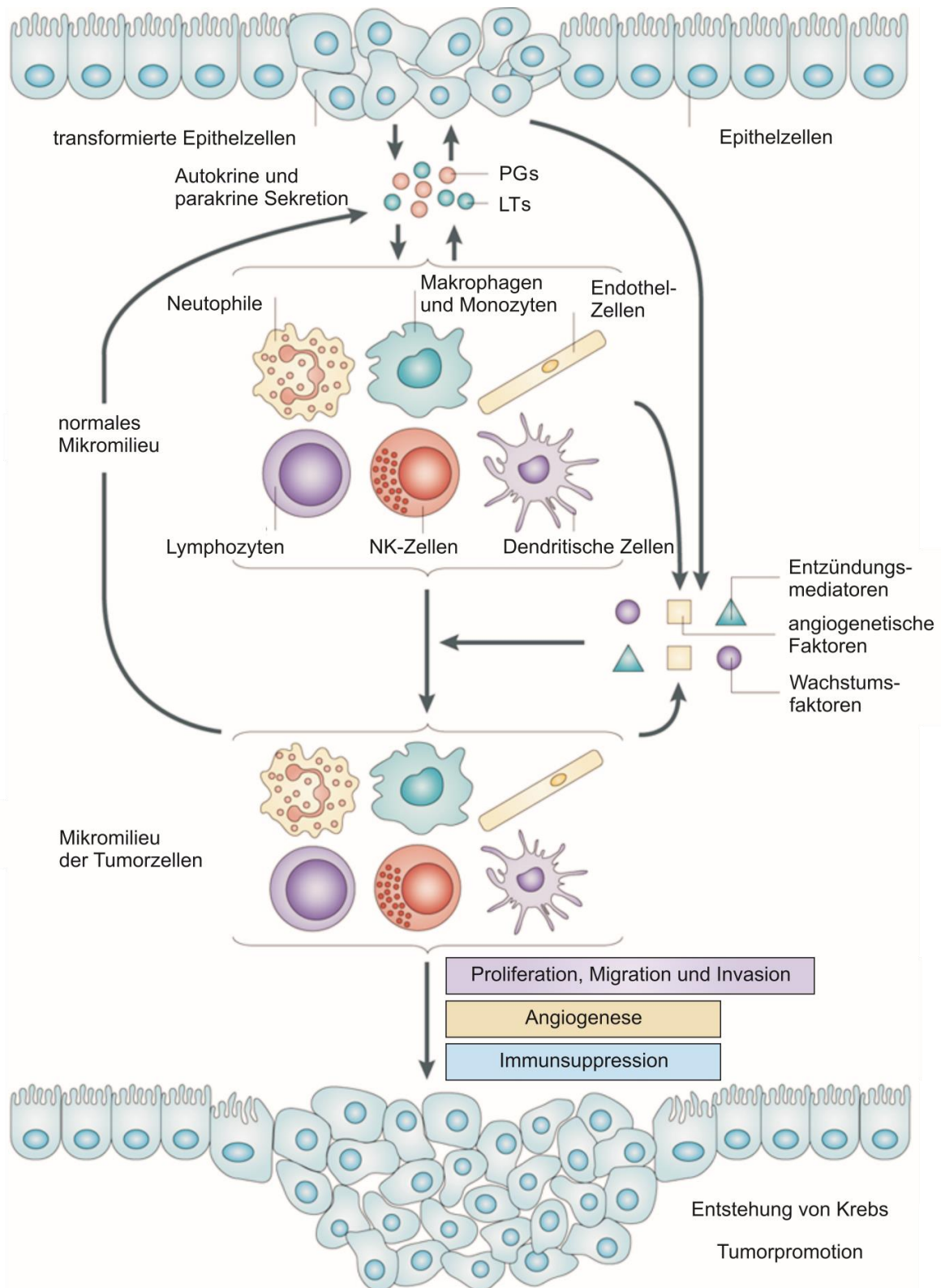


Abbildung 9. Entstehung von Krebs.

Model von pro-inflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen in der Entstehung von Krebs. LTs – Leukotriene; PGs – Prostaglandine. Modifiziert nach Wang *et al.* [149].

1.6 NF- κ B als zentraler Faktor in der Pathogenese chronischer Entzündungen in Korrelation mit Krebs

Als Gegenspieler von p53 fungiert der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Aktivator von anti-apoptotischen Genen nach Zellschädigungen. Die inhibitorischen Effekte von p53 und NF- κ B beruhen auf der Konkurrenz um die kompetitive Bindung an die Transkriptionskofaktoren p300 und CBP (*cAMP-responsive-element binding protein*) [164]. Im Falle eines Funktionsverlustes von Wildtyp-p53 durch GOF oder LOF kommt es zu einer gesteigerten Interaktion von p300 bzw. CBP mit NF- κ B und somit zur vermehrten Expression der NF- κ B-Targetgene [164,166,167]. Die Aktivierung des Überlebensprogramms wird als mögliche Ursache für häufig auftretende Resistenzen gegen Chemo- und Strahlentherapie betrachtet. NF- κ B spielt eine zentrale Rolle im Immunsystem sowie bei Entzündungsprozessen. Außer- und innerzelluläre Stimuli wie pathogene Signale, genotoxischer Stress, Wachstumsfaktoren (TNF- α oder IL-1) sowie Lipopolysaccharide führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors [168,169].

Die Aktivierung wird posttranslational reguliert, wodurch das Enzym in seiner aktiven Form in den Zellkern transloziert [170]. Die Regulation des Transkriptionsfaktors basiert auf einem negativen Feedback-Mechanismus, bei dem NF- κ B die Expression seines eigenen Inhibitors I κ B α induziert [171]. Durch diverse Studien an Knockout-Mäusen stellte sich heraus, dass einige NF- κ B-Proteine eine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr spielen. Neben seiner Funktion im Immunsystem, ist NF- κ B ein zentraler Regulator pro-inflammatorischer Gene, insbesondere für pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6, Chemokine, Oberflächenproteine sowie Zelladhäsionsproteine [168,169,172]. Eine konstitutive und erhöhte Expression von NF- κ B konnte in diversen Entzündungserkrankungen, wie Asthma oder Rheumatischer Arthritis nachgewiesen werden [173,174]. Diese dauerhafte Aktivierung führt zu einem kontinuierlichen Translozieren von aktivem NF- κ B in den Nukleus, was eine dysregulierte Targetgenexpression zur Folge hat [175][176]. Dabei werden Genen reguliert und induziert wie Inhibitoren der Apoptose (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Survivin* oder *TRAF1/2*) [177–179], Gene zur Förderung der Proliferation (*c-Myc* oder *COX-2*) oder Proteine die zur Adhäsion/Invasion bzw. Metastasierung beitragen [180–182]. Der Zusammenhang zwischen Endzündung und der Entstehung von Tumoren ist nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass Tumorerkrankungen häufig im Zusammenhang mit Infektionen und Entzündungen stehen. Beispielsweise eine chronische Infektion, verursacht durch eine Infektion mit

Hepatitis B oder C Viren stellt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms dar [183,184]. Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa können maßgeblich an der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms beitragen [185]. Eine erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B konnte in diversen Tumoren, wie z.B. akuter lymphatischer Leukämie, Burkitt Lymphom und Hodgkin Lymphom nachgewiesen werden [186,187]. Ein weiteres Schüsselenzym, welches durch NF- κ B im Entzündungsgeschehen reguliert wird, ist die Cyclooxygenase 2 (COX-2). Durch die transkriptionelle Hochregulation der COX-2 und 5-LO kommt es zur vermehrten Bildung von entzündungsfördernden Lipidmediatoren [182,188].

In Wildtyp-p53 exprimierenden Zellen führt die Bildung von ROS zu einer Aktivierung von Antioxidantien Genen (p21^{WAF1/CIP1}), die zur Prävention und Reparatur der Zelle dienen. Bei einer zusätzlich erhöhten Stressinduktion durch extra- oder intrazelluläre Stimuli führt die Aktivierung von p53 zur Induktion pro-oxidativer Gene und zur Eliminierung der Zelle [189]. Im Falle einer LOF Mutation kommt es zu einer Zunahme der ROS, die wiederum führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA, die zur Entstehung von Tumoren beitragen [93,189,190].

Für eine spezielle GOF-Mutante von p53 wurde eine Protein-Protein-Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B beschrieben. Durch die Bindung mit dem Transaktivator werden tumorassoziierte Targetgene wie CXCL1, IL-1 β , IL-6 oder IL-8, deren Aktivität normalerweise durch wtp53 reprimiert wird, aktiviert [191]. Die permanenten Wachstumssignale in der Zelle erhöhen das Risiko der Tumorentstehung um ein Vielfaches [149].

1.7 Regulation der 5-LO

1.7.1 Struktureller Aufbau der 5-LO

Die humane 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 78 kDa und wird durch das Gen *ALOX5* kodiert [192]. Die röntgenkristallographische Aufklärung der humanen 5-LO Struktur erfolgte erstmals im Jahr 2011 durch Gilbert *et al.* [192]. Das Enzym besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer kleineren N-terminalen regulatorischen C2-ähnlichen Domäne und einer größeren C-terminalen katalytischen

Domäne [193]. Die regulatorische Domäne besteht hauptsächlich aus acht β -Faltblättern, die über flexible Loopregionen miteinander verbunden sind. Diese Regionen beinhalten wichtige Bindestellen für die Calcium abhängige Membranbindung der 5-LO [194,195]. Die katalytische Domäne besteht vorwiegend aus α -Helices und beinhaltet das aktive Zentrum mit dem Nicht-Häm-Eisenatom [196]. Das Eisen wird dabei von drei konservierten Histidinen (H367, H372 und H550) sowie dem Isoleucin (Ile673) des C-Terminus gebunden [197]. Faktoren wie Calcium [194], Phosphatidylcholin [195] oder Diacylglyceride, wie OAG (1-Oleyl-2-Acethyl-sn-Glycerol) [198] können mit der regulatorischen Domäne der 5-LO interagieren und wirken stimulierend auf die Aktivität des Proteins. Neben diesen Bindestellen konnten zwei weitere Binderegionen sowohl in der C2-ähnlichen Domäne als auch im katalytischen Zentrum für das Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) charakterisiert werden [197].

1.7.2 Transkriptionelle Regulation der 5-LO-Expression

Das Gen *ALOX5* befindet sich auf Chromosom 10q11.21 und besteht aus 14 Exons separiert durch 13 Introns. Es umfasst einen Bereich von 71,9 Kilobasen (kb). Die *ALOX5*-Promotorsequenz ist sehr GC-Basen reich und enthält keine der typischen TATA- oder CCAAT-Boxen [199]. Innerhalb der Promotorsequenz konnten verschieden putative Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3, NF- κ B, PU.1, AP-2, Egr-1 und Egr-2 [136,200,201] nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine Erkennungssequenz für den Vitamin-D3-Rezeptor (VDR) und für TGF- β (*transforming growth factor beta*) nachgewiesen werden [136,202] (Abbildung 10).

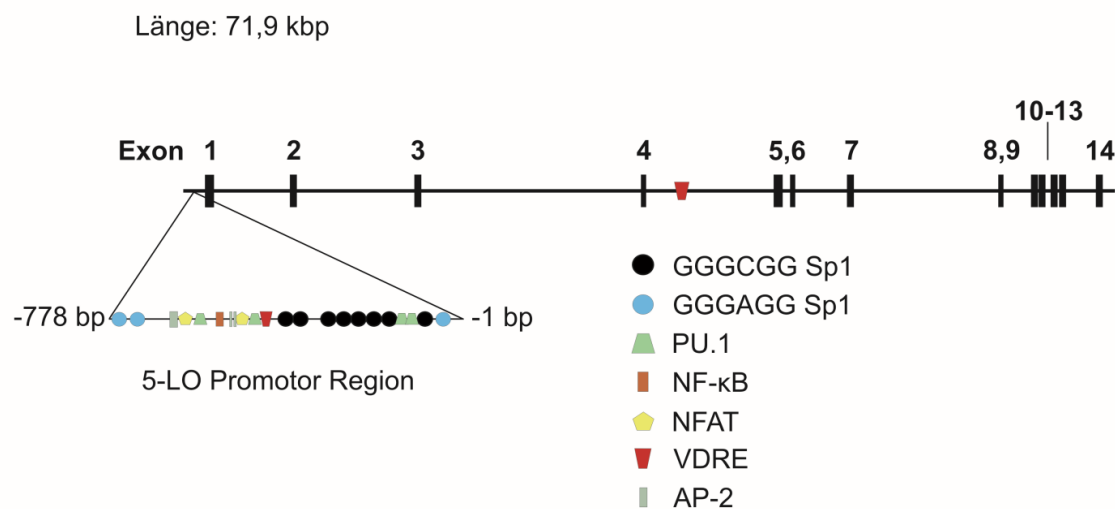


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Gens *ALOX5*.

Das Gen hat eine Länge von 71,9 kbp und besteht aus 14 Exons separiert durch 13 Introns. Dargestellt sind die verschiedenen putativen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren im 5-LO Promotorbereich, sowie distale Erkennungssequenzen.

In der *ALOX5* Promotorregion liegen mehrere GC-reiche Binderegionen die als Erkennungssequenz für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Egr-1 fungieren. Der Transkriptionsfaktor Sp1 gehört zu der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Sp1/Krüppel-ähnlichen), der ubiquitär in humanen Zellen exprimiert wird [201,203,204]. Als starker transkriptioneller Aktivator bindet Sp1 über ein Zinkfinger-Motiv an die DNA Konsensussequenzen 5'-GGCGGG-3'. Zudem rekrutiert und bindet Sp1 Koaktivatoren, wie (CBP)/p300 und verstärkt dadurch die Affinität der Sp1-DNA-Bindung zum Promotor [201].

Ebenso wie Sp1 gehört der Transkriptionsfaktor Egr-1 (*immediately early gene response-1*) zu den DNA-bindenden Zinkfingerproteinen und wirkt als transkriptioneller Aktivator [200]. Der Transkriptionsfaktor besitzt drei Zinkfingerdomänen die für die Bindung an die DNA-Konsensussequenz 5'-GCGGGGGCG-3' verantwortlich sind [201]. Die Expression von Egr-1 erfolgt vorwiegend in Zellen myeloiden Ursprungs und wird durch verschiedene Untergruppen der MAPKs (mitogen activated protein kinase), durch ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), JNK (c-Jun - amino-terminalen Kinase) sowie durch p38 reguliert [205]. Die p38/MAP-Kinase Kaskade wird durch zellulären Stress aktiviert und führt z.B. zur Bildung von TNF- α (*tumor necrosis factor α*) und anderen inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen [206].

Eine weitere Bindesequenz im Promotorbereich konnte für NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) charakterisiert werden [136]. NF- κ B ist ein zentraler Mediator im Immunsystem der durch die Aktivierung einer Vielzahl von Genen, die im Entzündungsgeschehen involviert sind, immunoregulatorische Eigenschaften besitzt. Stimuli wie genotoxischer Stress, Wachstumsfaktoren (TNF- α oder IL-1) sowie Lipopolysaccharide können unter anderem zu einer Aktivierung von NF- κ B führen [207][208]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B stellt einen Zusammenschluss aus Homodimeren oder Heterodimeren dar. Diese wiederum können aus fünf bzw. sieben verschiedenen Unter-Proteinen aufgebaut sein: p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100) [209]. In ungestressten Zellen liegt NF- κ B gebunden an I κ B α vor und wird dadurch inaktiviert. Durch Stress aktiviertes NF- κ B bindet wiederum an eine spezifisch DNA-Sequenz (Konsensus: 5'-GGGACTTTCC-3') und reguliert die Transkription von über 400 Genen, die unter anderem in Inflammation, Tumorzellproliferation, Invasion oder Chemoresistenz involviert sind [210]. Als Gegenspieler von p53 induziert NF- κ B im Zuge von Zellschädigungen die Transkription von anti-apoptotischen Genen und vermittelt so das Überleben von Zellen [211,212].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Faktoren wie TGF- β [213] und 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (VD3) zu einer Induktion der 5-LO während der Differenzierung myeloider Zelllinien (HL60 und MM6 (Mono Mac 6)) [214,215] sowie der Keratinozyten Zelllinie HaCaT führen [216]. Dies kann darauf zurück zu führen sein, dass innerhalb des *ALOX5*-Genes eine spezifische Bindungsstelle für den Vitamin D3-Rezeptor (VDR) sowohl im Promotor als auch distal auf dem Gen gefunden wurde. VDR gehört zu der Gruppe der intranuklearen Steroidhormonrezeptoren und bindet 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 mit hoher Affinität. Der Ligand-gebundene Rezeptor kann daraufhin an die spezifische Bindungsstelle in der Promotor- (-779 to -229) und der distalen Region von *ALOX5*, den VDRE's (Vitamin D Response Elements), binden und auf diese Weise die Transkription regulieren [217–220].

Die Behandlung der myeloiden Zelllinien HL-60 und MM6 mit Calcitriol und TGF- β führt zur Differenzierung der Zellen und einem deutlichen Anstieg der 5-LO-Expression und der Enzymaktivität [213,221]. Auch für Stimuli wie DMSO (Dimethylsulfoxid), PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*) oder GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) konnte eine deutliche Induktion der 5-LO mRNA beobachtet werden [213,221,222]. DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung spielen ebenso eine wichtige Rolle bei der Regulation der 5-LO Expression [219,223]. Durch die Behandlung der 5-LO-negativen

Zelllinien U937 und HL-60TB mit dem Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-Deoxycytidin, konnte eine Hochregulation der Expression der 5-LO gezeigt werden [223].

1.7.3 Regulation der zellulären 5-LO Aktivität

Die zelluläre Lokalisation der 5-LO wurde in verschiedenen Zelllinien charakterisiert und scheint zelltypspezifisch zu sein. In ruhenden peripheren Neutrophilen und Monozyten [224], in differenzierten HL60 [225] und MM6-Zellen [222] sowie in peritonealen Makrophagen [226] konnte eine Lokalisation vorwiegend im Zytosol nachgewiesen werden. In ruhenden alveolaren Makrophagen (AM) [224], Maus-Mastzellen [227], RBL-1-Zellen [228] und in humanen Langerhanszellen [229] konnte die 5-LO hauptsächlich in der nukleären Fraktion detektiert werden. Für den nukleären Import der zytosolischen 5-LO ist das Vorhandensein einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) erforderlich [230,231]. Durch verschiedene Stimuli kann es zur Aktivierung der 5-LO kommen, infolgedessen das Enzym an die Kernmembran transloziert (Abbildung 11) [195,232]. Durch die Interaktion mit FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) erfolgt die Umsetzung der Arachidonsäure. FLAP gehört zur MAPEG-Familie (*membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*) und nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der zellulären 5-LO-Aktivität ein [134,233]. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration begünstigt die Translokation der 5-LO an die Kernmembran. Dort konnte eine Kolokalisation mit FLAP und der zytosolischen Phospholipase A_2 (cPLA₂) nachgewiesen werden [234,235]. Des Weiteren wird die Aktivität des Enzyms, neben ATP und Ca^{2+} , durch verschiedene Phosphorylierungen reguliert. Dabei spielen die Kinasen aus der Familie der MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), wie ERK 1/2 und MAPKs p38, eine zentrale Rolle [236,237].

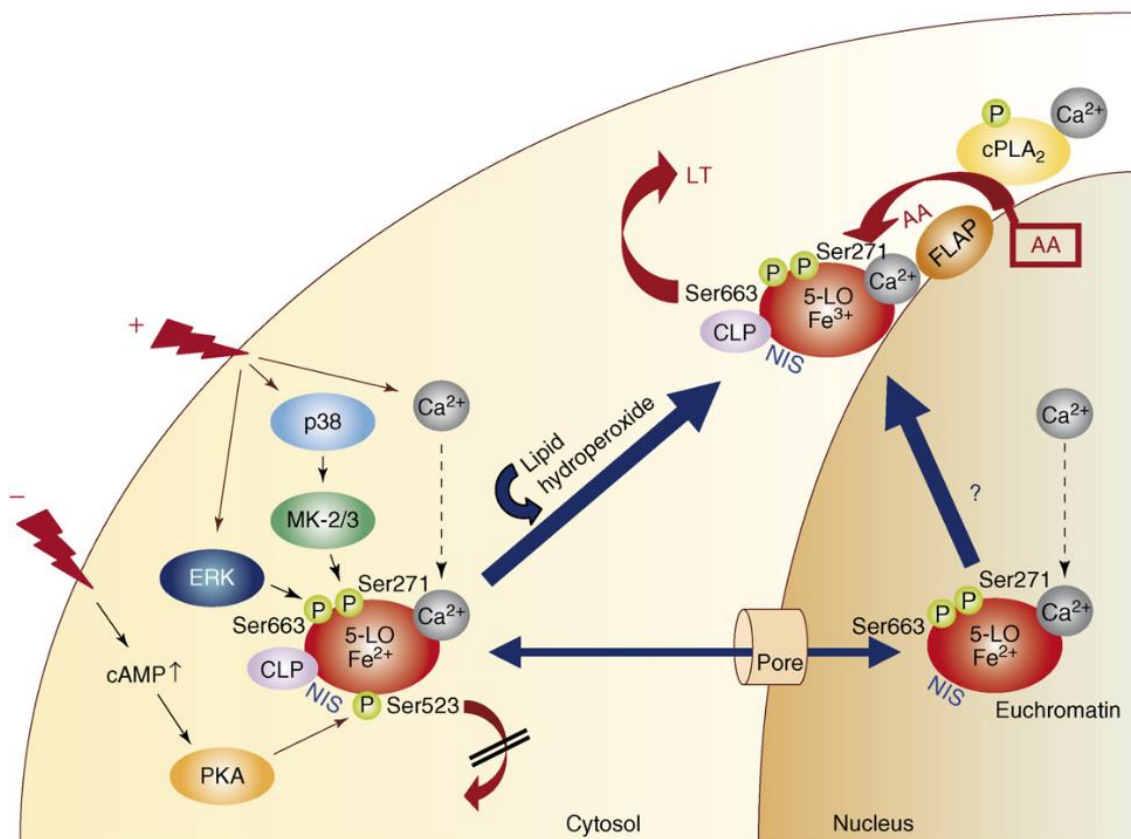


Abbildung 11. Regulation der zellulären 5-LO Aktivität nach Rådmark *et al.* [135].

Nach Aktivierung der 5-LO erfolgt die Translokation an die Kernmembran. Dort wird durch die cPLA₂ AA freigesetzt und mit Hilfe von FLAP zu LTs metabolisiert. In unstimulierten Zellen kann sich die 5-LO sowohl im Zytosol als auch im Zellkern befinden.

Die Phosphorylierungen an Serin-271 (MAPK) und Serin-663 (ERK2) bewirken eine Aktivierung des Enzyms, wohingegen die Phosphorylierung an Serin-523 (PKA) einen inhibitorischen Effekt zeigt [135,236,237]. Durch den Austausch der Aminosäure Serin-271 zu Alanin konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierungsstelle an der subzellulären Lokalisation der 5-LO beteiligt ist. Die Phosphorylierung an Serin-523 führt zur Inhibition der 5-LO. Diese Beobachtungen konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Zudem verhindert eine Phosphorylierung an dieser Position den nukleären Import der 5-LO [236,238,239].

1.8 Interaktionspartner der 5-LO

In den letzten Jahren konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden die mit der 5-LO interagieren können. Dazu zählt das Coactosin-Like-Protein (COTL1 bzw. CLP), welches zur Familie der Aktin-bindenden Proteine gehört [240]. Die Bindung zwischen 5-LO und CLP konnte mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-System bestätigt werden [241]. Weitere Proteine die mit der 5-LO direkt interagieren sind Dicer [242] und TRAP (*TNF receptor-associated protein 1*). Dicer gehört zu der Familie der Endoribonukleasen (Typ III) und ist an der Prozessierung von doppelsträngiger RNA in kürzere siRNA-Fragmente (*small interference RNAs*) beteiligt, die nachträglich die Spaltung homologer mRNA durch RISC (*RNA induced silencing complex*) regulieren. Die Bindung von Dicer erfolgt an die C2ld der 5-LO. Ein funktioneller Effekt der Bindung konnte bis heute nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt isolierte 5-LO die Fähigkeit über die kurze Prolin-reiche Region (Aminosäuren 566-577), die als Bindungsmotiv für SH3-Domänen (*Scr homology 3*) fungieren kann, an das GST-Grb2-Fusionsprotein binden zu können [243]. Eine direkte Interaktion zwischen FLAP und 5-LO konnte bisher nicht gezeigt werden. 2008 konnten Ye *et al.* mittels Co-Immunopräzipitation die Cyclooxygenase-2 (COX-2) als Interaktionspartner der 5-LO im Zytosol nachweisen [244].

1.9 Bisherige Studien zu potenziellen Interaktion zwischen p53 und 5-LO

Catalano *et al.* beschrieb erstmalig 2004 einen Zusammenhang zwischen der Expression der 5-LO und der Aktivität von p53 [245]. Die Studien befassten sich mit Zelllinien die einen unterschiedlichen p53-Status aufwiesen (wt-p53, mutp53 und p53-negativ). In den Experimenten wurden die Zellen mit verschiedenen genotoxischen Stimuli, wie Etoposid, behandelt. In Folge der verwendeten Stimuli konnte eine zeitabhängige, gesteigerte Akkumulierung der 5-LO-Expression beobachtet werden. Da diese Effekte in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar waren, wurde eine p53 unabhängige Regulation der 5-LO vermutet. Weiterführende Experimente befassten sich mit der Lokalisation von 5-LO und p53. Dafür wurden 5-LO-negative Zelllinien mit wt-5-LO und mut-5-LO überexprimiert. Mittels Konfokalmikroskopie wurden die Proteine p53 und PML untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass wt-5-LO die Interaktion von p53 und PML inhibiert und apoptotische Targetgene, wie *BAX* und *PIG3*, vermindert exprimiert wurden. Für mut-5-LO konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden [246].

Posttranslationale Modifikationen von p53 führen zu einer Aktivierung und Stabilisierung des Proteins. 2005 beschrieb Catalano *et al.* eine Stabilisierung von p53 durch überexprimierte 5-LO. Diese erfolgt posttranslational durch Phosphorylierung von Serin-15. Zusätzlich wurde ein Seneszenz-ähnlicher Wachstumsarrest durch einen p53/p21-abhängigen Signalweg diskutiert [247].

Daten von Torosyan *et al.* weisen ebenfalls auf eine direkte Regulation der 5-LO durch p53 hin. In Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass sowohl p53 als auch Annexin A7 (ANXA7) Einfluss auf die AA-vermittelte Wachstumskontrolle in der Tumorsuppression einnehmen können [248].

Zielsetzung

Ziel der Dissertation ist die Charakterisierung der humanen 5-LO als potenzielles, direktes Targetgen des Transkriptionsfaktors p53. Bereits vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die 5-LO-Promotorsequenz einige klassische Konsensus-Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren wie Sp1, Sp3, NF- κ B oder Egr-1/2 aufweist.

Ausgehend von Chromatin-Immunpräzipitation-Sequenzierungen soll die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an das Gen *ALOX5* untersucht werden. Der transkriptionelle Regulationsmechanismus soll durch Methoden, wie ChIP und Reporteragen Analysen, genauer charakterisiert werden.

Neben der Aufklärung der Transkriptionsaktivität des *ALOX5*-Gens soll der Einfluss von verschiedenen p53-exprimierenden Zellen (wtp53, mutp53 und p53-null Zelllinien) hinsichtlich ihrer 5-LO-Expression analysiert werden.

Da die Überexpression der 5-LO sowie ein erhöhter Spiegel an pro-inflammatorischen Mediatoren einen proliferierenden Einfluss auf Tumorzellen haben können, soll eine direkte Interaktion von p53 mit der 5-LO *in vitro* durch Immunfluoreszenz und Co-Immunopräzipitation untersucht werden. Darüber hinaus soll der Einfluss der 5-LO auf die p53-vermittelte transkriptionelle Expression charakterisiert werden.

Des Weiteren soll untersucht werden, welchen physiologischen Effekt ein 5-LO-Knockdown auf Wildtyp- und p53-Null-Zelllinien ausübt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Arachidonsäure	Cayman Chemical Company, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumionophor A23187	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEPC	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Applichem, Darmstadt, Deutschland
DTT	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EGTA	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Etoposid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd, mind. 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glykogen	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	VWR International, Darmstadt
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nariumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NP-40/ Igepal	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polypren	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
UltraPure Agarose	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Einwegmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Einwegmaterialien

Name	Hersteller
15 ml, 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Vollpipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
6 Well, 24, 96 well plates	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
60/15 mm, 145 mm Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
75 ml, 175 ml, 250 ml Gewebekulturflaschen	VWR International, Darmstadt, Deutschland

Agar Schalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Glasplatten	bsb 11 Biotech Service blu, Nottuln, Deutschland
Kryoröhrchen 2 ml PP	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
LoBind Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wessling, Deutschland
Objektträger und Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland
PP-PCR-Platten 96 well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 5 ml (Polystyrol, FACS Röhrchen)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Membran (PVDF)	GE Healthcare Amersham (Buckinghamshire, Großbritannien)
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Klebefolie für MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 ml)	Life Technologies (applied biosystems), Darmstadt, Deutschland
10er, 12er, 15er Kämme (1.5 mm)	bsb 11 Biotech Service blu, Nottuln, Deutschland
Spacerplatten (1.5 mm)	bsb 11 Biotech Service blu, Nottuln, Deutschland
0,22 µm, 0.45 µm Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose Membran Pierce 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
0.2 ml, 1.5 ml, 2 ml Eppi	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
0,5-10 µl, 200 µl, 1000 µl Spitzen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
12-Tube magnetic Separation Rack	New England Biolabs, Frankfurt,

	Deutschland
Bioruptor® Standard	Diagenode, Seraing, Belgien
DNA Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD, Heidelberg
Gelelektrophoresekammer - Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Criterion™ Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Inkubatoren für Zellkulturen	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Konfokalen Laser Mikroskop von Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Krefeld, Deutschland
Mikroskop, Olympus CK-2	Olympus, Japan
Mikrozentrifugen, Fresco™	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Nano Drop	NanoDrop Technologies, USA
Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
peqSTAR Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettierhilfe, Accu- jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator MaxQ4000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Kendro-Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland
Sonifizierer – Sonifier® W-250® D	Heinemann (Ultraschall und Labortechnik), Schwäbisch Gmünd, Deutschland
StepOne™ Real-Time PCR System	Life Technologies (applied biosystems), Darmstadt, Deutschland
Ultraschallspitze MS72D	Bandelin, Berlin, Deutschland
UV-Transilluminator GelDoc	Bio-Rad, München, Deutschland
VV3 Vortexer	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großwedel
Zellzählsystem – TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland

Zentrifuge - Varifuge 3.0R	Kendro-Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland
----------------------------	--

2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Dual-Glo® Luciferase Assay System Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, Georgien
GenElute® PCR Clean-up Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Life Technologies (Applied Biosystems®), Darmstadt, Deutschland
NucleoBond® Xtra Maxi / Maxi Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

2.1.5 Verwendete Beads

Tabelle 5: Verwendete Beads

Name	Hersteller
Dynabeads® Protein A: 10001D	Life Technologies (NOVEX®), Darmstadt, Deutschland
Dynabeads® Protein G: 10003D	Life Technologies (NOVEX®), Darmstadt, Deutschland
Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin-gekoppelte Dynabeads® M280: 11205D	Life Technologies (Invitrogen®), Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Verwendete Enzyme und Reagenzien

Tabelle 6: Enzyme und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
100bp-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
1Kb-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
6x DNS Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Complete protease inhibitor cocktail (EDTA free)	Roche, Mannheim, Deutschland
Desoxynucleotid-Mischung (dNTP; 10mM je Nucleotid)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DNA Restriktionsendonucleasen: XhoI, HindIII-HF	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNase I (RNase-free)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	Life Technologies (Applied Biosystems®), Darmstadt, Deutschland
PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards (Dual color)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards (All blue)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RiboLock™ RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RNase A	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
--------------------	--

2.1.7 Verwendete Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Name	Typ	Hersteller	Kat.Nr
Anti-5-LO (Klon 1551)	Rabbit, monoclonal	Karolinska Institut Olof Rådmark	
Anti-acetyl-p53 (Lys320)	Rabbit, polyclonal	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	06-915
Anti-acetyl-p53 (Lys382)	Rabbit, monoclonal	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	04-1146
Anti-Bax (2D2)	Mouse, monoclonal	Santa Cruz Biotechnologies	Sc:20067
Mouse anti-human 5-LO 6A12	Mouse, monoclonal, IgG1	Goethe-Universität Frankfurt a.M.	-
NCL-p53- CM1 (CM1)	Rabbit; polyclonal	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	M29-P
Normal mouse IgG	Mouse, monoclonal	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-2025
Normal rabbit IgG	Rabbit, monoclonal	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-2027
p21 waf1/Cip1 (DCS60)	Mouse, monoclonal	Cell Signaling Technology®	2946
Purified Mouse Anti-Human 5-LO	Mouse, monoclonal, IgG1	BD Pharmingen™	610694
Purified Mouse Anti-Human p53 (DO-1)	Mouse IgG2a, κ	eBIOSCIENCE	14-6786
α-Actin	Mouse, monoclonal	Sigma-Aldrich,	A2228

β -Tubulin	Mouse, monoclonal	Deutschland	T0198
		Sigma-Aldrich, Deutschland	

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C, 5% CO₂ und in einer 95% relativen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für das Passagieren der adhärenenten Zellen wurden diese mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2-5 ml TE-Puffer gelöst, in serumhaltigem Medium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl auf eine neue Platte bzw. Flasche überführt. Falls nicht anders angegeben, wurden allen Medien die Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Zusätzlich wurde den Medien zumeist 10% fötales Kälberserum (FCS) sowie die Aminosäure L-Glutamin (2 mM) beigefügt.

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Wirt	Ursprung	p53 Status
U2OS (ATCC# HTB-96)	Human	Osteosarkoma	wtp53
HCT116 (ATCC# CCL-247)	Human	kolorektales Karzinom	wtp53
MCF7 (ATCC# HTB-22)	Human	Mammakarzinom	wtp53
U-87 MG (ATCC# HTB-14)	Human	Glioblastom	wtp53
HCT116p53-/- (Vogelstein)	Human	kolorektales Karzinom	p53 null
H1299 (ATCC# CRL-5803)	Human	Lungenkarzinom (NSCLC)	p53 null
U-87MGp53-/- (ATCC# HTB-14)	Human	Glioblastom	p53 null

SK-BR-3 (ATCC# HTB-30)	Human	Brustadenokarzinom	Mut p53
MDA-MB-231 (ATCC# HTB-26)	Human	Brustadenokarzinom	Mut p53
T98G (ATCC# CRL-1690)	Human	Glioblastom	Mut p53

2.2.2 Zellkulturmedien

Tabelle 9: Verwendete Zellkulturmedien

Medien	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS) ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Trypsin EDTA	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM ohne Phenolrot	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland

2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Lagerung der Zellen für einen längeren Zeitraum wurden abtrypsinierte und mit PBS gewaschene Zellen (1×10^7) in einem Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Am darauffolgenden Tag erfolgt die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -120°C. Für ein schonendes Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C kurz inkubiert und in vorgewärmtem Medium

resuspendiert. Um das toxische DMSO zu entfernen wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und in frischem Medium in eine Zellkulturflasche ausgesät.

Tabelle 10: Einfriermedium

Puffer	Zusammensetzung
Einfriermedium	90% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO

2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels elektronischem Zellzählgerät

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl Trypanblau-Lösung vorsichtig resuspendiert. Mit Hilfe des Zellzahlgerätes 'TC10 automated Cell Counted' wurde die Zellzahl bestimmt.

Tabelle 11: Trypanblau-Lösung

Puffer	Zusammensetzung
Trypanblau-Lsg.	0,4% (w/v) Trypanblau; 0,81% (w/v) NaCl; 0,06% (w/v) KH ₂ PO ₄

2.2.5 Behandlung der Zellen mit Zytostatikum

Für die Behandlung der Zellen wurden je nach Versuch die Zellen am Vortag passagiert und auf neue Zellkulturplatten ausgesät. Zur Untersuchung wurden die Zellen zum einen mit dem Zytostatikum Actinomycin D (5 nM) oder Etoposid (10 µM) behandelt. Zur Inkubation mit Actinomycin D oder Etoposid wurden Verdünnungen aus den entsprechenden Stammlösungen in dem verwendeten Medium hergestellt.

2.2.6 Zellextraktion

Zur Isolierung von Protein aus Zellextrakten wurden Zellen in einer Dichte von $1-5 \times 10^6$ auf 10 cm auf Zellkulturschalen ausplattiert und bei 37°C 5 % CO₂ inkubiert. Unbehandelte sowie behandelte Zellen wurden nach der festgelegten Inkubationszeit mit kaltem PBS

gewaschen und mit 100 µl Lyse-Puffer mittels Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall (MS 72, 20 % Input) behandelt und anschließend für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels NanoDrop 2000 vermessen.

Tabelle 12: Zell-Lyse-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Zell-Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM EDTA pH 8; 10% (v/v) Glycerol; PIC 40 µl/ml; 0,1% (w/v) BSA

2.2.7 SDS-Page

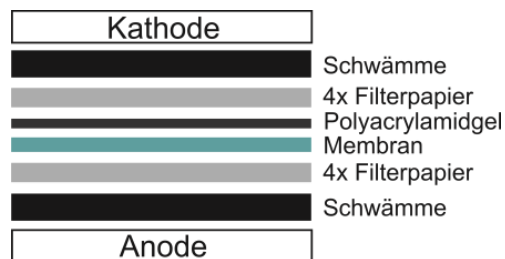
Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über ein Gelelektrophoresesystem der Fa. BioRad nach Laemmli *et al.* [249]. Vor dem Auftragen wurden 100-150 µg Gesamtproteinextrakt mit H₂O und 4 x Ladepuffer auf ein Volumen von 40 – 50 µl eingestellt, für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend in die Taschen des Sammelgels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-120 Volt.

Tabelle 13: SDS-Page Puffer

Puffer	Zusammensetzung
4 x Ladepuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% (v/v) SDS; 40% (v/v) Glycerol; 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau
Laufpuffer	20 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS auf 1 L H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8

2.2.8 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde das Proteingemisch mittels Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Das für den Transfer verwendete Filterpapier, Schwämme sowie die PVDF-Membran wurden vor der Benutzung in Transferpuffer getränkt. Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte über das Wet-Blot Verfahren von BioRad durch Zugabe des Transferpuffers über einen Zeitraum von 80 min bei konstanten 95 Volt. Aufbau des Systems:



Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde weiter nach Herstellerprotokoll verfahren (LI-COR's Odyssey® Infrared Imaging System Protokoll). Die Membran wurde für 1 Stunde bei RT in 1:1 PBS-Odyssey-Blocking-Puffer und zur Detektion der Proteine über Nacht mit der entsprechenden Primärantikörperlösung inkubiert. Durch nachfolgende Waschschriffe (3 x 5 min) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Die anschließende Inkubation der Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 45 min bei RT in abgedunkelten Reaktionsgefäßen. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Detektion der Proteine mittels LI-COR's Odyssey® Infrared Imaging System durchgeführt. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in verdünntem Blocking-Puffer angesetzt. Das Verhältnis der Sekundärantikörperverdünnung betrug 1:10.000.

Tabelle 14: Western Blot Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blocking-Puffer	1:1 Blocking-Puffer in 1x PBS
TBS	150 mM NaCl; 7,7 Tris-HCl pH 7,4
Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol auf 1 L H ₂ O
Waschpuffer - TBST	1 L (v/v) TBS/H ₂ O 0,5% (v/v) Tween 20

Tabelle 15: Sekundärantikörper für den Western Blot

Verwendete Sekundärantikörper	Verdünnung
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (LI-COR P/N 926-68070)	1:10.000
IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG (LI-COR P/N 926-68071)	1:10.000
IRDye®800CW Goat anti-mouse IgG (LI-COR P/N 926-32210)	1:10.000
IRDye®800CW Goat anti-Rabbit IgG (LI-COR P/N 926-32211)	1:10.000

2.2.9 Entfernen gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen nach Li-COR®

Das Entfernen von an eine Membran gebundenen Antikörpern erfolgte durch die Inkubation mit 10 ml Stripping-Lösung für 10-15 min bei Raumtemperatur. Für diese Methode wurde der NewBlot™ WesternBlot-Stripping-Buffer der Fa. Li-COR verwendet (1:5 in PBS verdünnt). Vor erneuter Antikörperzugabe wurde die Membran jeweils 3 x 10 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen und erneut mit Odyssey Blocking-Puffer inkubiert.

2.2.10 RNA-Isolierung und darauffolgende cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Expressionsveränderungen wurden Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden behandelt. Die Zellyse erfolgte mit 1 ml Trizol Reagent (TRIzol Reagent®). Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform 15 Sek. gevortext. Nach drei- minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, 4°C). Der klare lösliche Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol 10 min auf Eis stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 min. Das so entstandene Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, zentrifugiert, für 1 min getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu vermeiden, wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurden den Proben jeweils 15 µl DNaseI (1U/µL), 15 µl DNaseI-Puffer, 1 µl RNase Inhibitor (RiboLock) und 19 µl DEPC-H₂O zugesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte durch eine zweistufige Phenol-Chloroform Fällung. Hierbei wurden die Proben mit 150 µl Phenol-

Chloroform (pH 4,3) versetzt, gevortext und bei 13.000 rpm bei RT für 1 min abzentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang wurde wiederholt. Die Präzipitation der RNA erfolgte über Nacht bei -80°C nach Zugabe von 17 µl einer 3 M NaAc Lösung und 375 µl 100% EtOH. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4°C) pelletiert und nochmals mit 70 % EtOH gewaschen. Das RNA Pellet wurde danach bei RT für 2 min getrocknet und in 25-50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop.

Für die cDNA Synthese wurde jeweils 1 µg RNA in einem Endvolumen von 9 µl (mittels DEPC-H₂O) eingesetzt. Die reverse Transkription der RNA zu cDNA erfolgte über das High Capacity RNA-to-cDNA Kit nach Herstellerprotokoll.

Tabelle 16: Zusammensetzung der cDNA Synthese

cDNA Synthese	
RT Puffer (2X)	10 µl
Enzym Mix (20x)	1 µl
RNA Probe	9 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 37°C für 60 min. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 95°C für 5 min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde im Anschluss 1:20 mit DEPC-H₂O verdünnt und mittels RT-qPCR quantifiziert oder bei -20°C gelagert.

2.2.11 Quantitative RT-qPCR (Real-time PCR)

Die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) ist ein Verfahren zur Replikation von DNA und dient zur Quantifizierung von ChIP sowie cDNA. Die Quantifizierung erfolgte mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Für die PCR wurden jeweils 5 µl der präparierten ChIP-DNA oder 5 µl des 1:50 verdünnten Inputs verwendet. Für die Expressionsanalyse wurden jeweils 100 ng Template-DNA sowie 10 pmol der beiden Primer eingesetzt. Die RT-qPCR wurde mittels StepOne™ von Applied Biosystems® durchgeführt.

Tabelle 17: PCR Ansatz pro Probe

PCR-Ansatz	
SYBR Green qPCR Master mix (2 X)	12,5 µl
Primer-Mix	1 µl
H ₂ O	6,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 18: Verwendetes PCR Programm

PCR-Programm	
Zyklus 1 (1 x)	95°C für 3 min
Zyklus 2 (40 x)	95°C für 15 sek 58°C für 45 sek
Zyklus 3 (1 x)	95°C für 1 min
Zyklus 4 (1 x)	65°C für 30 sek
Zyklus 5 (60 x)	65°C für 10 sek
Erhöhung der Temperatur um 0,5°C nach Zyklus 2	

Zur Quantifizierung der DNA-Amplifikation wurde die $\Delta\Delta C_t$ Methode nach Livak *et al.* [250] verwendet. Für die Normierung der amplifizierten DNA wurden das Referenz-Gen *HPRT1* verwendet.

Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide für die Expressionsanalyse

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	T_m [°C]	Verwendung
ALOX5 ex-F	5'-CGCCGACTTTGAGAAAATCT-3'	59,5	Expression
ALOX5 ex-R	5'-GGCTGCACTCTACCATCTCC-3'	59,8	Expression
BAX ex.-pr_F	5'-TTCATCCAGGATCGAGCAG-3'	59,9	Expression
BAX ex.-pr_R	5'-TTGAGACACTCGCTCAGCTT-3'	58,9	Expression
HPRT1 ex.-pr_F	5'-TCATCACATCTCGAGCAAGAC-3'	59,0	Expression
HPRT1 ex.-pr_R	5'-ATGCTGAGGATTTGGAAAGG-3'	59,1	Expression
MDM2 ex_F	5'-TAGACCTGTGGGCACGGA-3'	61,3	Expression
MDM2 ex_R	5'-TTGCCTGGATCAGCAGAGAAAAAG-3'	66,0	Expression

P21 ex.-pr_F	5'-CTTTCTGGCCGTCAGGAACA-3'	63,6	Expression
P21 ex.-pr_R	5'-CTTCTATGCCAGAGCTCAACATGT-3'	62,0	Expression
TP53 ex.F	5'-TCATCTGGACCTGGGTCTTC-3'	60,0	Expression
TP53 ex.R	5'-TCCCCGGACGATATTGAAC-3'	60,7	Expression
PUMA ex.-pr_F	5'-GAAACGGAATGGAAAGCTATGAGA-3'	62,8	Expression
PUMA ex.-pr_R	5'-GCAGACCCCATGCCAAATT-3'	63,1	Expression
EGFR ex_F	5'-CCAAGGCACGAGTAACAAGC-3'	60,8	Expression
EGFR ex-R	5'-AAATTCCCAAGGACCACCTC-3'	60,2	Expression
PCNA ex_F	5'-AGCATCTCCAATATGGCTGAG-3'	59,3	Expression
PCNA ex_R	5'-ATGCCTTCTGGTGAATTTGC-3'	60,1	Expression
CyclinD1 ex_F	5'-TGAACCTACCTGGACCGCTTC-3'	60,3	Expression
CyclinD1 ex-pr_R	5'-CTTAGAGGCCACGAACATGC-3'	60,8	Expression
BTG2 ex_F	5'-CCCTATGAGGTGTCCTACCG-3'	59,4	Expression
BTG2 ex_R	5'-CCTCGTACAAGACGCAGATG-3'	59,5	Expression
PTEN ex_F	5'-AGACCATAACCCACCACAGC-3'	59,9	Expression
PTEN ex_R	5'-TCGTCCCTTTCCAGCTTTAC-3'	59,3	Expression
GADD45α ex_F	5'-ATGGATAAGGTGGGGGATG-3'	59,4	Expression
GADD45α ex_R	5'-TGGATCAGGGTGAAGTGGAT-3'	60,3	Expression
BcLXL ex_F	5'-CTCCGATTTCAGTCCCTTCTG-3'	59,8	Expression
BcLXL ex_R	5'-GGAGCTGGTGGTTGACTTTC-3'	59,7	Expression
PAG ex_F	5'-TCCCCTCCCTTCGATAACTC-3'	60,4	Expression
PAG ex_R	5'-GCCACCAGGTCTACAGGAAC-3'	59,6	Expression
DR5/Killer ex_F	5'-CGCGTGCTGATTTATGTGTC-3'	60,3	Expression
DR5/Killer ex_R	5'-TGTGGTGGAATTTGCAGTTG-3'	60,6	Expression
P2XM ex_F	5'-CGGAGAAGTATGTGATGACCAG-3'	59,6	Expression
P2XM ex_R	5'-ATAGACCACGATCCCAAACCTG-3'	58,9	Expression
NOXA ex_F	5'-GAGGCTCTGTCTGACTTCTGG-3'	59,2	Expression
NOXA ex_R	5'-AGCTGCGTGCTAGTCGATGG-3'	60,0	Expression
DDB2 ex_F	5'-CTGAACCCATGCTGTGATTG-3'	60,1	Expression
DDB2 ex_R	5'-TGTGAGGTGCTGGAAGTGAC-3'	59,9	Expression

Die Primer wurden mit Hilfe des WebTools Primer3web Version 4.0.0 erstellt.

2.2.12 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden U2OS-Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^7 in 15 cm Kulturschalen ausgesät und für 24 Stunden behandelt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen, jedoch unbehandelt, mitgeführt. Am Folgetag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2,5 ml einer 1% Formaldehyd-Lösung (Crosslinking) 30 min fixiert (ChIP-Puffer A). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl einer 1,25 M Glycin-Lösung für 5 min bei RT gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 0,5 ml ChIP-Puffer B für 10 min bei 4°C inkubiert und mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 4°C), in 10 ml kaltem ChIP-Puffer C resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (5 min, 1600 rpm, 4°C) bevor das Zellpellet in 1-2 ml Inkubationspuffer resuspendiert wurde. Um das Chromatin in einigen hundert Basenpaaren Länge (100-600 bp) zu reduzieren, wurde dieses mittels Ultraschalls für 15-20 min bei high power, 30 sek ON, 30 sek OFF sonifiziert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C) konnte das Chromatin in einem Volumen von 200 µl aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt werden. Für die Immunopräzipitation wurden sowohl Protein-A als auch Protein-G gekoppelte Sepharose-Beads verwendet. Zur Vorbereitung wurden jeweils 50 µl der Beads (je Reaktionsansatz) in einem 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäß vorgelegt und zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen. Der Ansatz für die Immunopräzipitation setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 20: ChIP Ansatz pro Probe

ChIP-Ansatz pro Proben	
präparierte Beads	30 µl
BSA	12 µl 2,5%
PIC	12 µl 25x
Inkubationspuffer	36 µl 5x
Chromatin	120 µl
Antikörper	1-2 µg
H ₂ O	300 µl

Der Reaktionsmix wurde mittels Wasser auf ein Endvolumen von 300 µl eingestellt und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. 50 µl des aliquotierten Chromatins wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am darauffolgenden Tag für den Input verwendet. Die über Nacht inkubierte Immunopräzipitation wurde in einem 6 stufigem Schritt mit vier verschiedenen ChIP-Wasch-Puffern (1-4) für jeweils 10 min bei 4°C gewaschen. Zuerst erfolgte das zweimalige Waschen mit dem Waschpuffer 1. Die Beads wurden nach jedem Waschschrift mittels Zentrifugation am Boden fixiert und der Überstand dekantiert. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer 2 sowie 3 erfolgte ein weiterer zweimaliger Waschschrift mit Waschpuffer 4. Um die DNA-Protein-Komplexe von den Beads zu lösen wurden diese mit 200 µl ChIP-Elutionspuffer für 20 min rotierend bei RT inkubiert. Zeitgleich wurden die 50 µl des Inputs mit 150 µl Elutionspuffer versetzt und ebenfalls mitrotiert. Die Beads wurden von den DNA-Protein-Komplexen durch Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT) getrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um den Crosslink zwischen Protein und DNA zu lösen wurden die Proben durch Zugabe von 8 µl einer 5 M NaCl-Lsg. bei 65°C für 4-5 Stunden in einem Thermoschüttler bei 1300 rpm inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte durch eine Phenol-Chloroform Fällung. Hierbei wurden die Proben zunächst mit 200 µl Phenol versetzt und abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, RT). Der lösliche, klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl Chloroform erneut zentrifugiert. Die Präzipitation des Überstands erfolgte durch Zugabe von 22 µl einer 3 M Na-Acetat Lsg. und 100% kaltem EtOH über Nacht bei -20°C. Die DNA kann zusätzlich mit 10 µl Glycogen (2 µg/ml) angefärbt werden. Die Proben wurden am darauffolgenden Tag zentrifugiert (20 min, 4°C, 13.000 rpm). Nach dem Waschen mit 250 µl 70% kaltem EtOH erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT für einige Minuten getrocknet und im Anschluss in 50 µl H₂O für 50 min bei RT gelöst. Die DNA Fragmente konnten anschließend mittels quantitativer RT-qPCR analysiert werden. Dazu wurden jeweils 5 µl der präparierten DNA sowie 5 µl des Inputs (zuvor 1:50 verdünnen in H₂O) eingesetzt.

Tabelle 21: Verwendete ChIP-Primer

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Tm [°C]	Verwendung
Myo-ChIP_F	5'-CTCATGATGCCCCTTCTTCT-3'	59,2	ChIP
Myo-ChIP_R	5'-GAAGGCGTCTGAGGACTTAAA-3'	58,6	ChIP
ALOX5-ChIP_F	5'-TGTGTGACTTGGGAGAGCTG-3'	60,0	ChIP
ALOX5-ChIP_R	5'-TGTGTGCTAGGGGCTTTACC-3'	60,1	ChIP
P21-ChIP_F	5'-CTTTCTGGCCGTCAGGAACA-3'	63,6	ChIP
P21-ChIP_R	5'-CTTCTATGCCAGAGCTCAACATGT-3'	62,0	ChIP
BAX-ChIP_F	5'-TTCATCCAGGATCGAGCAG-3'	59,9	ChIP
BAX-ChIP_R	5'-TTGAGACACTCGCTCAGCTT-3'	58,9	ChIP

Tabelle 22: Verwendete ChIP-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ChIP-Puffer A	0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 50 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Puffer B	0,25% (v/v) Triton X-100; 10 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 20 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Puffer C	0,15 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 50 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Waschpuffer 1	0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) NaDOC; 1% (v/v) Triton X-100; 0,15 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 20 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Waschpuffer 2	0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) NaDOC; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 20 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Waschpuffer 3	0,25 M LiCl; 0,5% (w/v) NaDOC; 0,5% (v/v) NP-40; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 mM EGTA pH 8; 20 mM HEPES pH 7,6
ChIP-Waschpuffer 4 (10 x)	10 mM EDTA pH 8; 5 mM EGTA pH 8; 200 mM HEPES pH 7,6
Elutionspuffer	1% SDS, 0,1 M NaHCO ₃
Inkubationspuffer (5 x)	0,15 % SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA

2.2.13 Oligonukleotide-Pull-Down-Analyse (OPDA)

Zur Untersuchung der Protein-DNA-Bindungen wurden Oligonukleotide, komplementär zu untersuchenden Sequenz, am 5'-Ende biotinyliert. Das Annealing der Oligonukleotide erfolgte durch zweiminütiges Aufkochen bei 95°C und anschließendes langsames Abkühlen über Nacht im Thermoblock. Dafür wurden je 2,5 µl Oligonukleotide (100 pM) mit 6 µl einer 0,5 M NaCl-Lsg. und 19 µl H₂O angesetzt. Die Oligonukleotide wurden am nächsten Tag in 300 µl Binde-Puffer resuspendiert und mit 200 µl Zell-Lysat (500 µg) bei 4°C für 3,5 Stunden inkubiert. 50 µg Protein wurden zur Kontrolle (Input) verwendet.

Zur Vorbereitung der Präzipitation wurden jeweils 15 µl Streptavidin-konjugierten Beads pro Ansatz dreimal mit RotiBlock (1 x) gewaschen, in 500 µl RotiBlock resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Zum Blocken der Beads wurde zusätzlich BSA hinzugegeben (0,1 µg/µl Endkonzentration). Nach der Inkubationszeit wurden die präparierten Beads zu den Oligo-Lysaten hinzu pipettiert und für weitere 3 Stunden bei 4°C rotiert. Die Reaktionen erfolgen in 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäßen um unspezifische Bindungen zu minimieren. Nach 3-4 maligem Waschen mit Binde-Puffer für jeweils 10 min bei 4°C wurden die magnetischen Beads in 30 µl Binde-Puffer aufgenommen und mit 10 µl 4-fach Ladepuffer bei 95°C für 10 min aufgeköcht. Die Bindung der Proteine wurde mittels SDS-Page und darauffolgender Western Blot Analyse ermittelt.

Tabelle 23: Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	p53 - Motiv
OPDA_P1_F	AGGATGTCAGGAACATGTCAGTGTCCCAGAGCCATC AGGAACATGTCAGTGTCCCAGA	p53 Konsensus-Sequenz Motiv 1 und 2
OPDA_P1_R	TCTGGGACACTGACATGTTCTGATGGCTCTGGGAC ACTGACATGTTCTGACATCCT	5'-Biotin gekoppelter komplementärer Strang zu Motiv 1 und 2
OPDA_P2_F	GAGCCATCAGGAACATGTCAGTGTCCCAGAGCCATC AGGAACATGTCAGAGCATGTGG	p53 Konsensus-Sequenz Motiv 2 und 3
OPDA_P2_R	CCACATGCTCTGACATGTTCTGATGGCTCTGGGAC ACTGACATGTTCTGATGGCTC	5'-Biotin gekoppelter komplementärer Strang zu Motiv 2 und 3

OPDA_P3_F	GAGCCATCAGGAACATGTCAGAGCATGTGGGGACA TGTCAGAAAGTGTCT	p53 Konsensus-Sequenz Motiv 3 und 4
OPDA_P3_R	AGACACTTTCTGACATGTCCCCACATGCTCTGACAT GTTCTGATGGCTC	5'-Biotin gekoppelter komplementärer Strang zu Motiv 3 und 4
OPDA_negK_F	TTCTGGTTATTTTGTGGTCTTCTCTTTCTTTCTTTCC TTCCTTCTTGTCTT	p53 negativ Kontrolle
OPDA_negK_R	AAGACAAGAAGGAAGGAAAGAAGAAAGAGAAGACC ACAAAATAACCAGAA	p53 negativ Kontrolle (komplementär)
OPDA_Sp1_F	AGTACTGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGG GGCGGGGGCAGCCGGG	<i>ALOX5</i> Promotor Sequenz Pos. Kontrolle für Sp1
OPDA_Sp1_R	CCCGGCTGCCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC GCCCCGCAGTACT	<i>ALOX5</i> Promotor Sequenz (komplementär)

Tabelle 24: OPDA Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Bindepuffer	50 mM KCl; 5% (v/v) Glycerol; 10 mM MgCl; 1 mM EDTA pH 8; 1 mM DTT; 25 mM HEPES pH 7,6

2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Färbung der U2OS-Zellen wurde auf unbeschichteten Deckgläschen (VWR) durchgeführt. Die Deckgläschen wurden dafür in 3,5 cm Zellkulturschalen überführt und diese dann mit einer 2 ml Zellsuspension von 2×10^4 bedeckt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 Stunden im Brutschrank bevor diese für 48 Stunden behandelt wurden. Nach dem Absaugen des Mediums und eines fünfminütigen Waschen (PBS), folgte die Fixierung der Zellen (4% Formaldehyd in PBS, 30 min). Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 30-45 min mit 5% Milch in TBS (0,2% Triton X-100) behandelt. Auf den Deckgläschen erfolgte nun die Mehrfachfärbung von p53 und 5-LO. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit den Primären-Antikörpern inkubiert. Als Kontrollen dienten Einzelfärbungen der jeweiligen Primär- oder Sekundärantikörper. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen 3 x 5 min gewaschen und für 1 Stunde abgedunkelt mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (15 min, RT). Die

Einschlussimmobilisierung der Präparate erfolgte durch die Mowiol-Einbettung auf einem Objektträger. Die Deckgläschen wurden zusätzlich mit einem Klarlack auf dem Objektträger fixiert und in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei 4°C aufbewahrt. Die Messung wurde an einen Konfokalen Laser Mikroskop von Leica TCS SP5 (Frankfurt Center for Advanced Light Microscopy [FCAM]) durchgeführt und mittels Fiji Software (www.fiji.sc) nachbearbeitet.

Tabelle 25: Immunfluoreszenz Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Antikörperlösung	1% (w/v) Milch gelöst in TBS (0,2% (v/v) Triton X-100)
Blocking Puffer	5% (w/v) Milch gelöst in TBS (0,2% (v/v) Triton X-100)
Wasch-Puffer	TBS (0,2% (v/v) Triton X-100)

Tabelle 26: Immunfluoreszenz Primärantikörper

Verwendete Primärantikörper	Verdünnung	Verwendete Sekundärantikörper	Verdünnung
5-LO (Maus)	1:50	Alexa-488 gekoppelten anti-Maus IgG (Life Technologies)	1:2000
5-LO (1551)* (Kaninchen)	1:50	Alexa-594 gekoppelten anti-Kaninchen IgG (Life Technologies)	1:2000
NCL-p53-CM1 (Kaninchen)	1:100	Alexa-594 gekoppelten anti-Kaninchen IgG (Life Technologies)	1:2000
p53-DO-1 (Maus)	1:100	Alexa-488 gekoppelten anti-Maus IgG (Life Technologies)	1:2000
Acety-p53 (Lys320) (Kaninchen)	1:100	Alexa-594 gekoppelten anti-Kaninchen IgG (Life Technologies)	1:2000

* Hergestellt im Karolinska Institute der Arbeitsgruppe Olof Rådmark, Schweden

2.2.15 Lokalisationsassay

2 x 10⁶ behandelte sowie unbehandelte U2OS wurden in 300 µl NP-40-Lyse-Puffer aufgenommen, resuspendiert und jeweils 3 x 5 sec gevortext. Die Zellsuspension wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der nukleäre Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden zusammen mit 4x Ladepuffer für 10 min bei 95°C denaturiert. Das pelletierte Zellfragment wurde in 300 µl TKM-Puffer resuspendiert, für 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall (MS 72, 20 % Input) behandelt und in spezielle Ultrazentrifugen Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgt eine Trennung in zytosolische und membran Fraktion bei 38.000 rpm bei 4°C für 70 min. 100 µl des Überstandes wurden zusammen mit 4x Ladepuffer für 10 min bei 95°C denaturiert. Das Pellet wurde nochmals in 100 µl TKM-Puffer resuspendiert, für 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall (MS 72, 20% Input) behandelt und mit 4 x Ladepuffer für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden mittels Western Blots analysiert.

Tabelle 27: Lokalisationsassay Puffer

Puffer	Zusammensetzung
NP-40-Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,1% NP-40 (vor Verwendung: 10 µg/mL Leupeptin, 1 mM/mL PMSF, 60 µg/mL STI)
TKM-Puffer	50 mM Tris pH 7,4, 250 mM Sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA (vor Verwendung: 10 µg/mL Leupeptin, 1 mM/mL PMSF, 60 µg/mL STI)

2.2.16 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Für die Co-IP wurden transfizierte und behandelte Ganzzellextrakte aus U2OS-Zellen verwendet. Zur Vorbereitung der Co-IP wurden immobilisierte Dynabeads® mit Protein A sowie G (15 µl pro Ansatz) in 1% RotiBlock® (0,1 µg/µl BSA) gewaschen und in 500 µl bei 4°C für 30 min geblockt. Des Weiteren erfolgte eine zeitgleiche Vorinkubation der Zellextrakte mit einer geringen Menge an gewaschenen Beads (Pre-clear). Die geblockten Beads wurden im Anschluss mit den vorinkubierten Extrakten und den Antikörpern in einem Verhältnis von 30 µl Beads, 5 µg Antikörper (mouse anti-5-LO [BD] oder mouse

anti-IgG) zu 500 µg Protein, in 900 µl RIPA-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Präzipitationsansätze jeweils 2 x mit Wasch-Puffer 1 und 2 für je 10 min gewaschen. Die Proteine wurden nach dem Waschen mit 30 µl Elutionspuffer für 30 min bei 30°C eluiert, der Überstand mit 10 µl Ladepuffer bei 95°C für 10 min aufgekocht und mittels SDS-Page mit anschließende Western Blot analysiert.

Tabelle 28: Verwendete Puffer bei der Co-IP

Puffer	Zusammensetzung
Elutionspuffer	1% (w/v) SDS; 0,1 M NaHCO ₃
RIPA Puffer*	150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 50 mM Tris-HCl pH 8; 1% (v/v) NP-40; 0,5% (w/v) NaDOC; 0,1% (w/v) SDS
Wasch Puffer 1	150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 1% (v/v) Triton X-100; 20 mM Tris-HCl pH 8; 0,1% (w/v) SDS
Wasch Puffer 2	500 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 1% (v/v) Triton X-100; 20 mM Tris-HCl pH 8; 0,1% (w/v) SDS

* Zugabe von PIC und StosphoStopp

2.2.17 Transfektion von Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

24 Stunden vor der Transfektion wurden 5 x 10⁶ U2OS-Zellen in einer 10 cm Zellkulturplatte ausgesät und am folgenden Tag mittels Calcium-Phosphat-Präzipitaten transfiziert. Dafür wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zuerst die DNA von 10 µg (pcDNA3.1 und pcDNA3.1-5LO) in einem Gesamtvolumen von 440 µl H₂O vorgelegt und anschließend mit 500 µl 2 x HBS-Puffer (*HEPES Buffered Saline*) resuspendiert. Durch konstante Luftzufuhr erfolgte die Zugabe von 60 µl 2,5 M CaCl₂ Lösung. Die Reaktionsmische wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte ein Medienwechsel.

2.2.18 Calcium-Phosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln

24 Stunden vor der Transfektion wurden 5×10^6 HEK293T-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und am folgenden Tag mittels Calcium-Phosphat-Präzipitaten transfiziert. Für die Herstellung viraler Partikel wurde die Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 10 µg - pLKO.1 shRNA, 6.5 µg pCMVRΔ8.91 und 3.5 µg pMD2.VSVG in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Die weiteren Schritte der Transfektion erfolgten wie oben beschrieben. Die Überstände mit den viralen Partikeln wurden nach 48 und 72 h abgenommen und steril filtriert. Der Virusüberstand wurde entweder direkt zur Transduktion eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Tabelle 29: Puffer für die Transfektion

Puffer	Zusammensetzung
2xHeBS (HEPES Buffered Saline)	28 M NaCl; 5 M HEPES; 120 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,05

2.2.19 Transduktion von Zellen

Die zu transduzierenden Zellen wurden 24 h zuvor mit einer Dichte von 1×10^6 in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag mit PBS gewaschen, in 5 ml Medium aufgenommen und jeweils mit 5 ml aufgetauten, steril filtrierten Virusüberständen behandelt. Der Überstand wurde zusätzlich mit 4 mg/ml Polybrene versetzt. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit den Virusüberständen inkubiert bevor ein Medienwechsel folgte. Die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin erfolgte 72 Stunden nach der Transduktion für 5 Tage.

2.2.20 Propidiumiodid Färbung (PI)

Zur Analyse des Zellzyklus wurden 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden behandelt. Zur Erfassung der Gesamtpopulation wurde sowohl der Überstand als auch die abtrysinierten Zellen verwendet. Die überführte Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 6 min bei RT pelletiert und 2 x mit PBS gewaschen. Das

Zellsediment wurde anschließend in 0,6 ml einer 1%-igen FCS/PBS Lösung aufgenommen und resuspendiert. Die Fixierung erfolgte mittels Zugabe von 100% kaltem EtOH. Die Proben wurden über Nacht bei -20°C inkubiert. Die fixierten Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und nach Zugabe von 200 µg/ml RNaseA (Roche) und 5 µg/ml Propidiumiodidlösung für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die anschließende Analyse erfolgte im FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2 Kanal.

2.2.21 AnnexinV-FITC/PI-Färbung

Zur Analyse von apoptotischen Zellen wurden 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden mit 5 nM Act.D bzw. 10 µM Eto behandelt. Am Folgetag wurde der Überstand in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und ebenfalls in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe des Zellzählgerätes 'TC10 automated Cell Counted' wurde die Zellzahl bestimmt und jeweils 1×10^6 -Zellen in AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert. Daraus wurden anschließend 100 µl der Zellsuspension (1×10^5) in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 2 µl AnnexinV-FITC (5 µg/ml) sowie 10 µl PI-Lösung (Stammlösung 50 mg/ml) für 15 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung erfolgte die Zugabe von 400 µl Annexin-Bindepuffer. Die anschließende Analyse wurde unter Verwendung des FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2/FL-4-Kanal durchgeführt.

Tabelle 30: Puffer für die AnnexinV/PI-Färbung.

Puffer	Zusammensetzung
AnnexinV-Bindepuffer	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl, 25 mM CaCl ₂
PI-Stammlösung	50 mg/ml in 1xPBS

2.2.22 Zellviabilitätsassay – Kristallviolett-färbung

Für den Zellviabilitätsassay wurden jeweils 1×10^4 U2OS-Zellen und 5×10^4 HCT116-Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden behandelt. Am Folgetag wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit jeweils 200 µl 5%

Formaldehyd-Lsg. für 5 min fixiert. Nach dem Entfernen der Formaldehyd-Lsg. wurden die Zellen einmal mit 200 µl PBS gewaschen und mit 50 µl der 50%-igen Kristallviolett-Lösung für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, bevor sie mit 100 µl einer 33%-igen HOAc-Lösung für 5 min unter Schütteln inkubiert wurden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.)

2.2.23 Caspase-3 Assay

Zur Untersuchung der Caspase-3-Aktivität wurden U2OS- und HCT116-Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^6 in 10 cm Kulturschalen ausgesät und für 24 Stunden behandelt. Am Folgetag wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit 100 µl Lyse-Puffer mit einem Zellschaber von den Plattenböden abgelöst. Die Zellsuspension wurde 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall (MS 72, 20 % Input) behandelt und anschließend zentrifugiert (30 min bei 13.000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels NanoDrop 2000 vermessen.

Pro Ansatz wurden 250 µg Protein in einem Volumen von 50 µl in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und anschließend mit 40 µmol/L (in jeweils 50 µl) Caspase-3 Substrat (Ac-DEVD-AMC) für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Messung der Wellenlänge (λ Exzitation bei 380 nm und λ Emission bei 460 nm) am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.)

Tabelle 31: Puffer für den Caspase-3 Assay

Puffer	Zusammensetzung
Zell-Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM EDTA pH 8; 10% (v/v) Glycerol; PIC 40 µl/ml; 0,1% (w/v) BSA
Caspase-Puffer	42 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,3% (250 mM) CHAPS; 10 mM HEPES pH 7,4; PIC 40 µl/ml; auf 1 L H ₂ O

2.2.24 5-LO-Assay in Zellhomogenaten

Zur Untersuchung der 5-LO Aktivität wurden 1×10^7 U2OS-Zellen für 48 Stunden bei 37°C 5 % CO₂ behandelt, anschließend geerntet und in einer eiskalten PBS-Glukose-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 3 x 10 Sekunden sonifiziert (MS 72, 20% Input) und nach Zugabe von 5 µl 0,2 M ATP für 30 Sekunden bei 37°C vorinkubiert. Die Homogenate wurden mit 2 mM Calcium und 20 µM Arachidonsäure stimuliert und nach 10 min Inkubation bei 37°C mit 1 ml 100% MeOH abgestoppt. Die Analyse der 5-LO-Produkte LTB₄, 5-HETE, 12-HETE, 15S-HETE und PGE₂ fand mittels LC-MS/MS statt und wurde freundlicherweise von Carlo Angioni (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt.

Tabelle 32: Aktivitätsassay-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Glukose-Lsg.	1 mM EDTA pH 8; 1 g/L Glukose

2.2.25 Reporter-Gen-Assay (Luciferase-Assay)

24 Stunden vor Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 4×10^4 in DMEM (ohne Phenolrot) in einer 24-well Platte ausgesät. Die transiente Transfektion erfolgte nach Sambrook *et al.* für 16 Stunden. Pro Ansatz wurden 800 ng Luziferase Reporterkonstrukt, 100 ng des zu untersuchenden Expressionsvektors und 20 ng Renilla Luziferase Reporterkonstrukt eingesetzt. 40 Stunden nach der Transfektion wurde die Aktivität der Firefly und Renilla Luziferase nach Herstellerprotokoll mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega ermittelt. Die daraus resultierende Lichtemission wurde mit einem Luminometer TECAN infinite® M200 quantifiziert und als relative Lichtausbeute (Einheit: *relative light units*: RLU) angegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Extraktion von genomischer DNA aus U2OS-Zellen

Die Gewinnung der genomischen DNA erfolgte aus unbehandelten U2OS-Zellen mittels E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit nach Herstellerprotokoll. Für die Aufreinigung wurden insgesamt 25 µg DNA eingesetzt und jeweils 2 µl des Endvolumens dienten als DNA-Template in der PCR.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der genomische DNA

Zur spezifischen Amplifizierung der genomischen DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die genspezifischen Oligonukleotidprimer wurden aus den cDNA-Sequenzen abgeleitet und sind flankiert von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII*.

Tabelle 33: Restriktionsenzyme

Primer	Sequenz 5'→3'	T _m [°C]
p53_pN10_XhoI_for	TAGGCACTCGAGGCTCCTCGGCCCCAGAGG	59,1
p53_pN10_HindIII_rev	GCATAGAAGCTTTGCCTGGCATGCTCTGAGACA	59,0

Tabelle 34: PCR Ansatz pro Probe

PCR-Ansatz	
Taq-Polymerase 5 u/µl	1 µl
Primer	2 µM (je)
10 x Puffer	5 µl
dNTP-Mix 2 mM	5 µl (0.2 mM je)
Template-DNA	2 µl*
MgCl ₂	4 mM
H ₂ O	50 µl

* 2 µl der genomisch aufgereinigten DNA aus den U2OS-Zellen

Die Reaktion erfolgte in einer T-Gradient-PCR-Maschine von PEQLAB Biotechnologie.

Tabelle 35: PCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	1	
Annealing	53,5 +/- 2	0.30	38
Elongation	72	1	
Abschliessende Elongation	72	15	1

Zur Amplifikation folgten 38 Zyklen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend auf ein 2% Agarosegel aufgetragen.

2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierfür wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 1% bis 2% (w/v) Agarosegele eingesetzt. Zum Anfärben der DNA wurde der Interkalator Ethidiumbromid (2 µg/µl) verwendet. Die Proben wurden zuvor mit 6x Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen und bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein 100 bp und 1 kp Marker verwendet. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-Transilluminator.

2.3.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das GenElute™ Gel Extraction Kit von Sigma nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.3.5 DNA - Restriktionsanalyse

Zur Restriktion wurde jeweils 1 µg der amplifizierten DNA-Fragmente, Plasmid-DNA und die Enzyme *XhoI* und *HindIII* von NEB (NEB Biolabs, Inc, England) nach Hersteller verwendet. Der verdaut Vektor wurde zur Kontrolle auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit dem GenElute™ Gel Extraction Kit von Sigma nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die verdauten amplifizierten DNA-Fragmente wurden wiederum mit dem GenElute® PCR Clean-up Kit von Sigma eluiert.

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden 40 ng des geschnittenen Vektors (pN10) mit 200 ng des amplifizierten Inserts eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht mit der T4 DNA-Ligase bei 16°C. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers (NEB Biolabs, Inc, England).

2.3.7 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden 100 µl chemokompetente Bakterien-Kultur auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (50-100 ng) wurde zu den Zellen gegeben, vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min im Heizblock bei 42°C und nachfolgend eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Danach wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium überführt und für 45 min auf einem 37°C-Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Tabelle 36: Nährkulturmedien

Medien	Zusammensetzung
LB-Medium	12,5 g Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)®, powder ad 500 ml H ₂ O
LB-Agarplatten	6 g Agar-Agar, 10 g LB ad 500 ml H ₂ O
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Tabelle 37: Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Hersteller
<i>E.coli</i> -TOP10	F- F' {lacIq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Deutschland
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	Invitrogen, Deutschland

2.3.8 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- bzw. Maxipräparation)

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen wurden die angeimpften Übernachtskulturen (500 ml) bei abzentrifugiert (4000 g, 4°C, 20 min). Für die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurden, je nach Volumen der Kultur entweder das NucleoSpin-Plasmid-Kit (5 ml) oder das NucleoBond-Maxi-Kit (500 ml) von Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 μ l bzw. 100 μ l H₂O gelöst, vermessen und die gewünschte Konzentration eingesetzt.

Tabelle 38: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
pMD2.VSVG(env)	Hüllprotein-kodierende lentiviraler Vektor	Dr. M. Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt [251]
pLKO.1 - Puro	Lentiviraler Expressionsvektor für shRNAs	Sigma, Steinheim, Deutschland
pLKO.1 MISSION® shRNA-p53	Lentiviraler Expressionsvektor für shRNAs – humanes p53	Sigma, Steinheim, Deutschland
pCMX_p53 (wt/mut)	Expressionsvektor für humanes Wildtyp p53	Prof. Dr. B. Groner, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt [251]

pCMX_p53 (wt/mut)	Expressionsvektor für humanes mutiertes p53; Mutation in der DBD-R273H	Prof. Dr. B. Groner, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt
pN10-IntronG-p53motif	5-LO-Promotor-Reporterkonstrukt fusioniert mit p53-Motif und	Prof. Dr. D. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Gothe-Uni Frankfurt
pCGN	Expressionsvektor; CMV Promotor	Addgene, USA
pGL3-Basic	Luziferase Reporter Vektor	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Bax-Luc	Bax-Promotor-Reporterkonstrukt	M. Oren
pN10	5-LO-Promotor-Reporterkonstrukt	Prof. Dr. D. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Gothe-Uni Frankfurt
pRL-SV40	Renilla Luziferase-Kontroll-Reporterkonstrukt	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
pCMVRΔ8.91 HIV-1 Gag-Pol	Gag- und Pol-kodierender lentiviraler Vektor	Dr. M. Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt [251]
pcDNA3.1	Expressionsvektor; CMV Promotor	Invitrogen
pcDNA3.1-5LO	Expressionsvektor für die humane 5-Lipoxygenase; CMV Promotor	Karolinska Institut, Schweden, Olof Rådmark

Tabelle 39: Sigma MISSION®-p53-shRNA-Sequenzen

Klon ID	Sequenz 5'→3'	Gen-Region
NM_000546.x- 1095s1c1: TRCN0000003753	CCGGCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCGAGATTCTC TTCCTCTGTGCGCCGTTTTT	CDS
NM_000546.x-309s1c1: TRCN0000003754	CCGGTCAGACCTATGGAACTACTTCTCGAGAAGTAG TTTCCATAGGTCTGATTTTT	CDS

NM_000546.x-427s1c1:	CCGGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAACTCGAGTTCTGG	CDS
TRCN0000003755	GAGCTTCATCTGGACTTTTT	
NM_000546.x-941s1c1:	CCGGCACCATCCACTACAACACTACATCTCGAGATGTAG	CDS
TRCN0000003756	TTGTAGTGGATGGTGTTTTT	
NM_000546.x-11673s1c1:	CCGGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAACTCGAGTTCTGG	CDS
TRCN0000342259	GAGCTTCATCTGGACTTTTTG	

Tabelle 40: Sigma MISSION®-5LO-shRNA-Sequenzen

Klon ID	Sequenz 5' → 3'	Gen-Region
NM_000698.1-608s1c1:	CCGGCCTGTTTCATCAACCGCTTCATCTCGAGATGAAG	CDS
TRCN0000056568	CGGTTGATGAACAGGTTTTTG	
NM_000698.1-1039s1c1:	CCGGCGGGAGATGAGAACCCCTATTTCTCGAGAAATA	CDS
TRCN0000056569	GGGTTCTCATCTCCCGTTTTTG	
NM_000698.1-405s1c1:	CCGGCGAGATGACCAAATTCACATTCTCGAGAATGTG	CDS
TRCN0000056570	AATTTGGTCATCTCCGTTTTTG	
NM_000698.1-538s1c1:	CCGGCCCGTGATATCCAGTTTGATACTCGAGTATCAA	CDS
TRCN0000056571	ACTGGATATCACGGGTTTTTG	
NM_000698.1-1505s1c1:	CCGGCGAGGTGGTAGACATCTACTACTCGAGTAGTAG	CDS
TRCN0000056572	ATGTCTACCACCTCGTTTTTG	

2.4 Statistische Analysen

Die statistische Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität sowie die Expressionsanalysen wurde mittels einer ANOVA Analyse (one-way bzw. two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test) unter Verwendung der Software GraphPad-Prism5.01 ermittelt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind alle Daten als Mittelwert \pm SEM angegeben. Als signifikant gelten Werte $p < 0,05$. Als nicht signifikant (n.s.) gelten Werte $p > 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Actinomycin D (Act.D) und Etoposid (Eto) auf den Zellzyklus von U2OS-Zellen

Um Rückschlüsse daraus ziehen zu können, welche Einflüsse die Zytostatika Act.D und Eto auf die Zellen haben, wurden eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen jeweils mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt, nach 48 Stunden fixiert und einer Propidiumiodid-Färbung unterzogen. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde das Zellzyklusprofil der Zellen bestimmt und über die Software MotFit LT-V3.3.11 (MAC) quantifiziert. Durch die Färbung mittels PI erfolgt eine Erfassung des DNA-Gehalts und ermöglichte somit die Bestimmung der Zellzyklusphasen einer Gesamtpopulation. Diese Phasen untergliedern sich in eine G_0G_1 -Phase (Ruhephase), S-Phase (Synthese Phase), G_2M -Phase (Mitose) und eine Sub- G_1 -Phase bei denen die Zellen in Apoptose übergehen. Es wurden zwischen 10000 - 20000 Zellen gemessen.

Wie aus den Zellzyklusprofilen hervorgeht, zeigten die Zellen nach DNA-schädigender Behandlung eine signifikante Änderung in der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Bei der Behandlung mit Act.D kam es nach 48 Stunden zu einem Wachstumsarrest der Zellen in der G_0G_1 -Phase (Ruhephase). Im Gegensatz dazu, führte die Behandlung mit Etoposid zu einem Anstieg der G_2M - und Sub- G_1 -Phase, die für die apoptotische Eliminierung der Zellen spricht. Zusammenfassend zeigte die durchflusszytometrische Analyse, dass die verwendeten Zytostatika eine Stressantwort der Zellen hervorrufen.

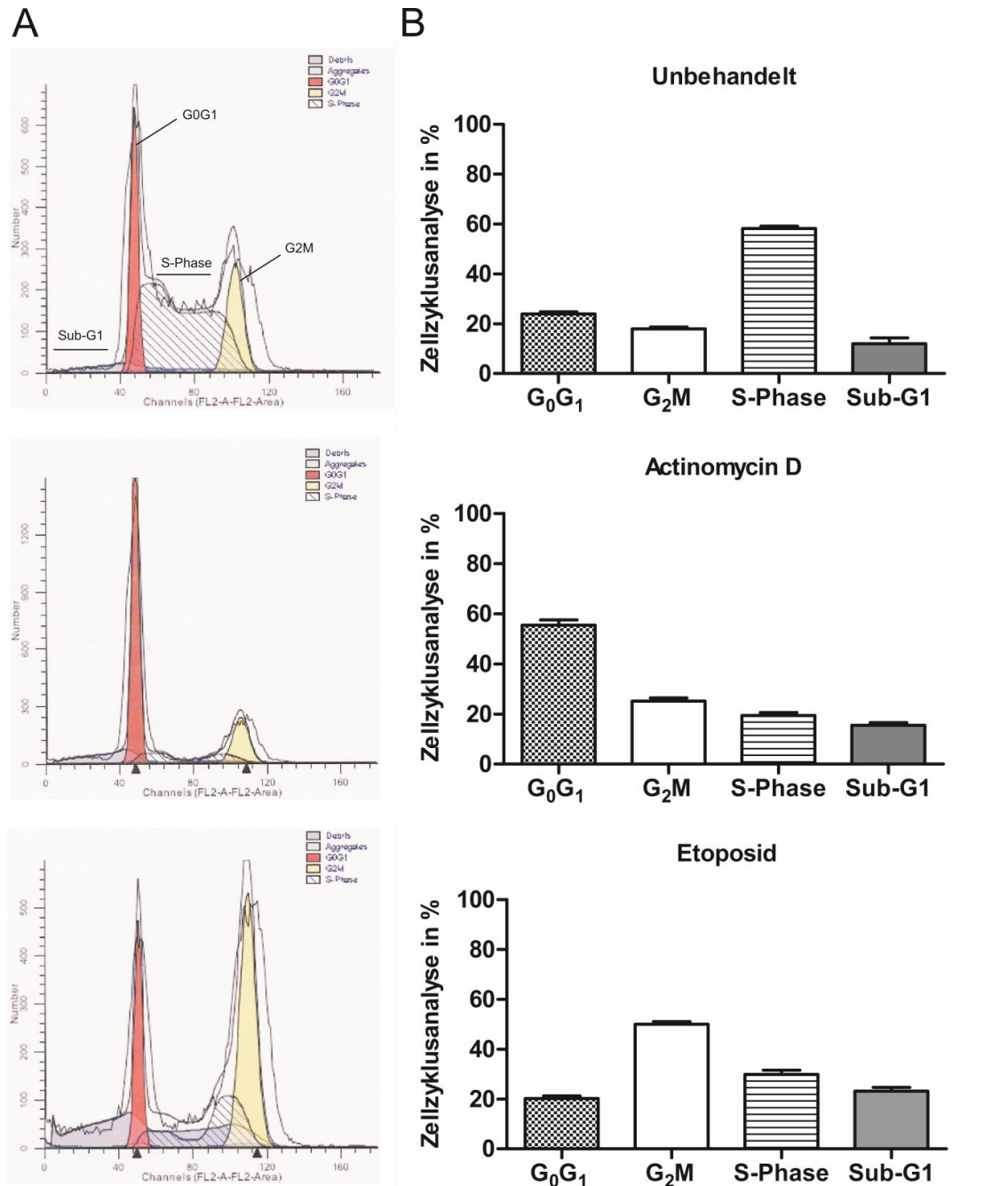


Abbildung 12. Einfluss von Act.D und Eto auf den Zellzyklus in U2OS-Zellen.

Es wurden 2×10^6 U2OS-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und anschließend für 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt. Die geernteten Zellen wurden in 0,6 ml einer 1%-igen FCS/PBS Lösung aufgenommen und mit 1,4 ml 100% kaltem EtOH fixiert. Nach Zugabe von 200 μ g/ml RNaseA (Roche) und 5 μ g/ml Propidiumiodidlösung (20 min Inkubation) erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung des Zellzyklus im FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2-Kanal. (A) Dargestellung des Zellzyklus in einem DNA-Histogramm-Plot. Der erste Peak stellt die G₀G₁-Phase (Ruhephase) und der zweite Peak die G₂-Phase (Mitose) dar. Dazwischen liegt die S-Phase (Synthese-Phase). Vor der G₁-Phase findet sich die Sub-G₁-Population (apoptotische Zellen). (B) Quantitative Auswertung der Histogramme in Prozent. Die Ergebnisse repräsentieren sechs unabhängige Experimente.

3.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch DNA-schädigende Stress-Stimuli

In intakten, ungestressten Zellen ist die Konzentration an p53 eher gering. Ist die Zelle jedoch Einflüssen wie oxidativen Stress, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, Hypoxie, DNA-Schäden oder fehlerhafter Zellteilung ausgesetzt, kommt es zu einer koordinierten Regulation der p53-Aktivität innerhalb der geschädigten Zelle. Aktivierung und Stabilisierung von p53 führt zu einer darauffolgenden p53-vermittelten autoregulatorischen Aktivierung des Gens *TP53*.

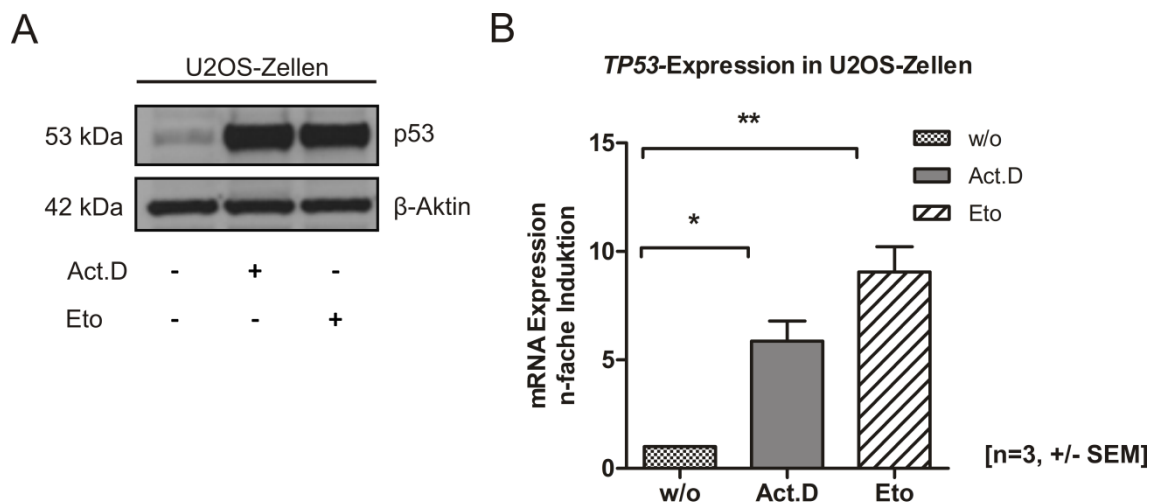


Abbildung 13. Expression von *TP53* in U2OS-Zellen.

(A) RT-qPCR-Analyse der Expression von *TP53*. Untersucht wurden die p53 Wildtyp exprimierenden Zelllinien U2OS. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert. Die Darstellung zeigt die Induktion von *TP53* bezogen auf unbehandelte Zellen. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente, **p < 0,01; *p < 0,05 verglichen mit den unbehandelten Zellen. (B) Die Zellen wurden mit Act.D oder Eto inkubiert und nach 24 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle dient β -Aktin.

Um den Einfluss der Zytostatika auf die Protein- und Transkriptelevon p53 zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen jeweils mit Act.D oder Eto behandelt und nach 24 Stunden in einer Expressionsanalyse oder in einer Immundetektion untersucht.

Abbildung 13A zeigt eine repräsentative Western Blot Analyse bei der eine deutliche Induktion der Proteinkonzentration von p53 im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu

erkennen ist. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die Bestimmung der *TP53*-Expression mit Hilfe der quantitativen RT-qPCR zeigte ebenfalls eine Induktion der p53-Transkriptmenge in den behandelten Zellen, Act.D * $p < 0,05$, Eto ** $p < 0,01$ (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Um die Expressionsänderung vergleichen zu können wurden unbehandelten Zellen als Referenzwerte gesetzt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Zytostatika eine transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors erzielt wurde. Über die Induktion von p53 wurde nachfolgend die Transkription von klassischen sowie potentiellen Targetgenen untersucht.

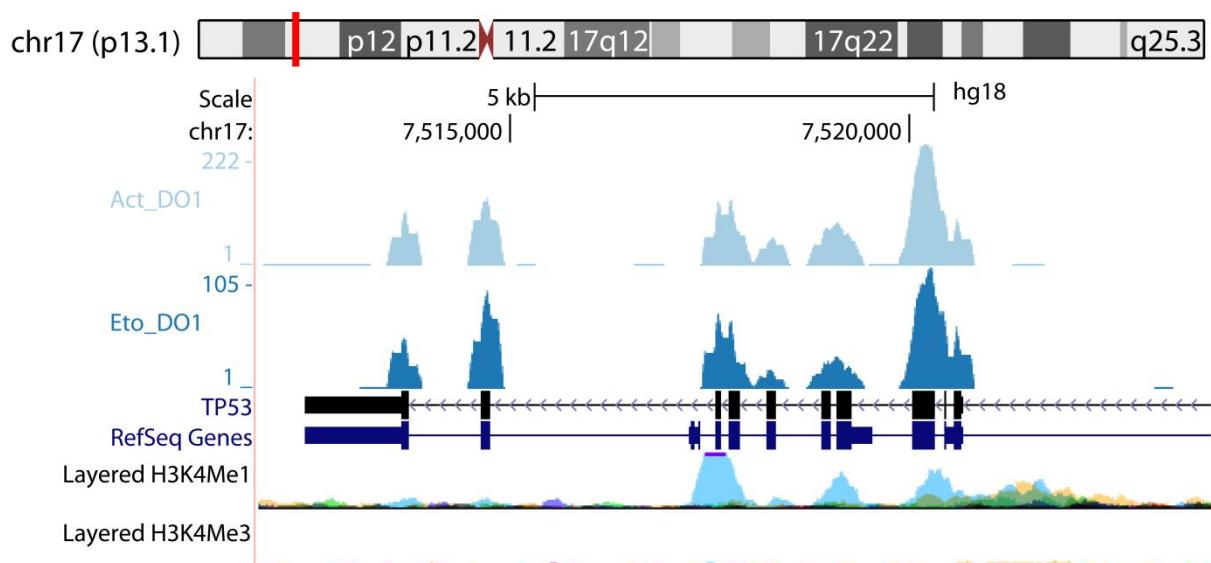
3.3 ChIP-Seq-basierte Identifizierungen genomweiter DNA-Bindestellen von p53

Der Tumorsuppressor p53 ist ein sequenz-spezifisch bindender Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung durch genotoxischen Stress eine Vielzahl an Genen regulieren und induzieren kann. Die Chromatin-Immunopräzipitation Sequenzierung wurde verwendet, um die *in vivo* Protein-DNA-Bindungsstellen von dem Transkriptionsfaktoren p53 auf genomweiter Ebene zu quantifizieren und zu analysieren. In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hendrik G. Stunnenberg (Nijmegen Center of Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands) wurde eine solche Sequenzierung durchgeführt, die uns freundlicherweise durch die Kooperation mit Dr. Marion Lohrum zur Verfügung gestellt wurden. Durchführung und Quantifizierung der ChIP-seq-Daten können aus den Unterlagen von Leonie Smeenk [108,252] entnommen werden. Das genomweite p53-Bindeprofil wurde anschließend in den UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) hochgeladen und mit dem Humanen Genom (NCBI build 36.1; hg18) verglichen. Dabei konnten die Bindungsmuster von p53 an klassische bekannte und potenziell neue Targetgene genauer untersucht werden.

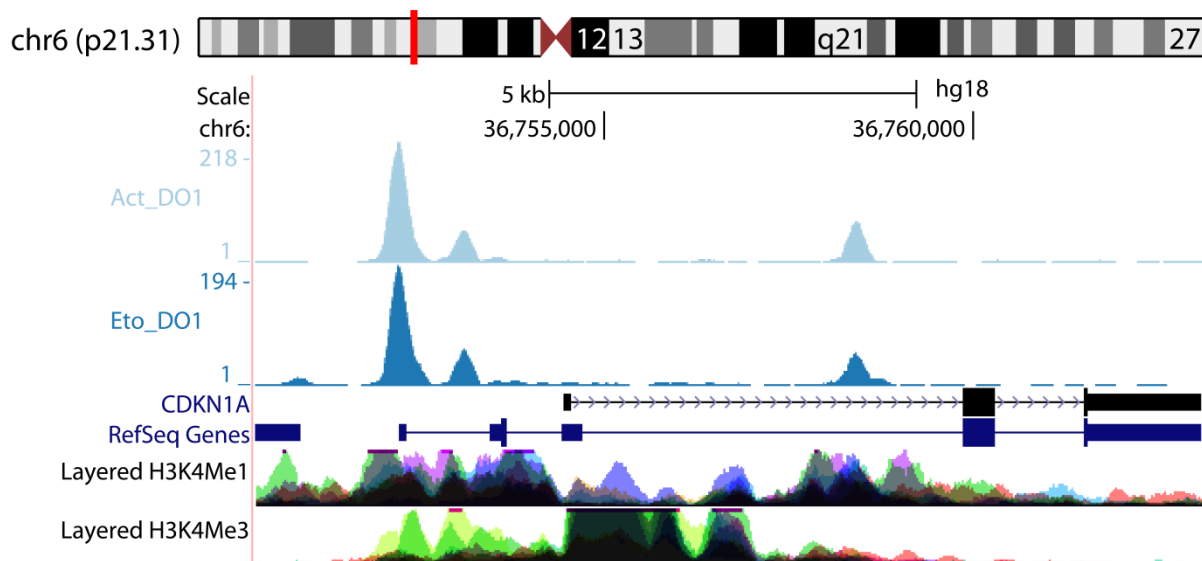
3.3.1 Bindung des wtp53 Proteins an die chromosomalen *MDM2*-, *CDKN1A*- und *BAX*-Promotoren

Mit Hilfe der ChIP-Seq konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die chromosomalen Promotoren der Targetgene *MDM2*, *CDKN1A* und *BAX* nachgewiesen werden. Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden der kommerziell zur Verfügung stehende Antikörper (DO-1), der gegen p53 gerichtete ist, eingesetzt. Innerhalb der genomischen Organisation der *MDM2*, *CDKN1A* und *BAX* Gene lassen sich signifikante Read-Anreicherung im Promotor durch eine Bindung des p53 Transkriptionsfaktors erkennen. Des Weiteren befindet sich eine Read-Anreicherung im Intron 1 des Gens *CDKN1A*.

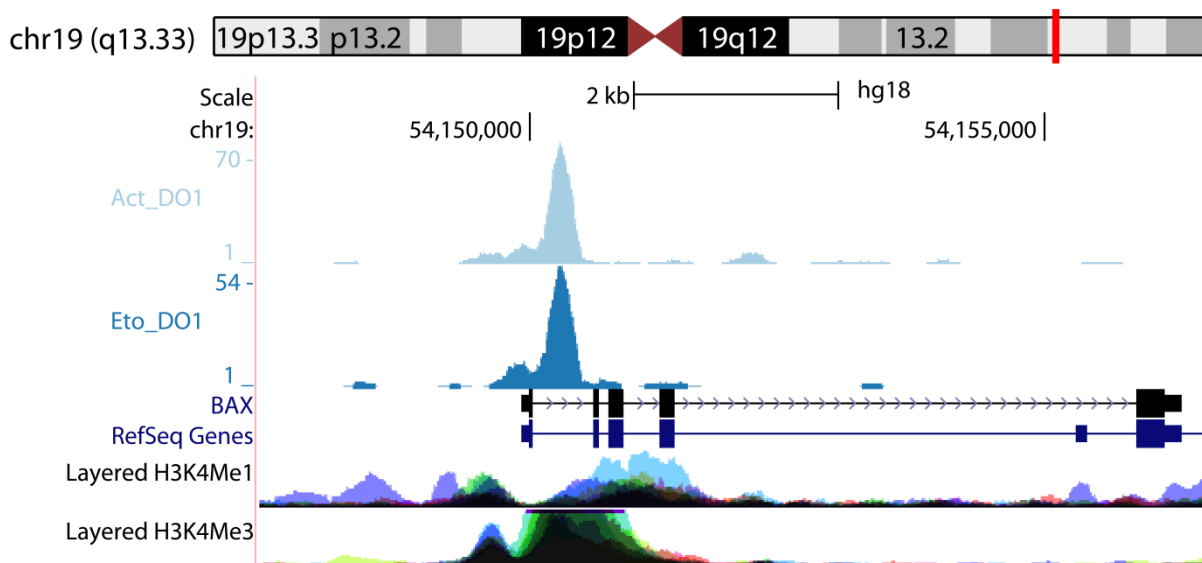
TP53



CDKN1A



BAX



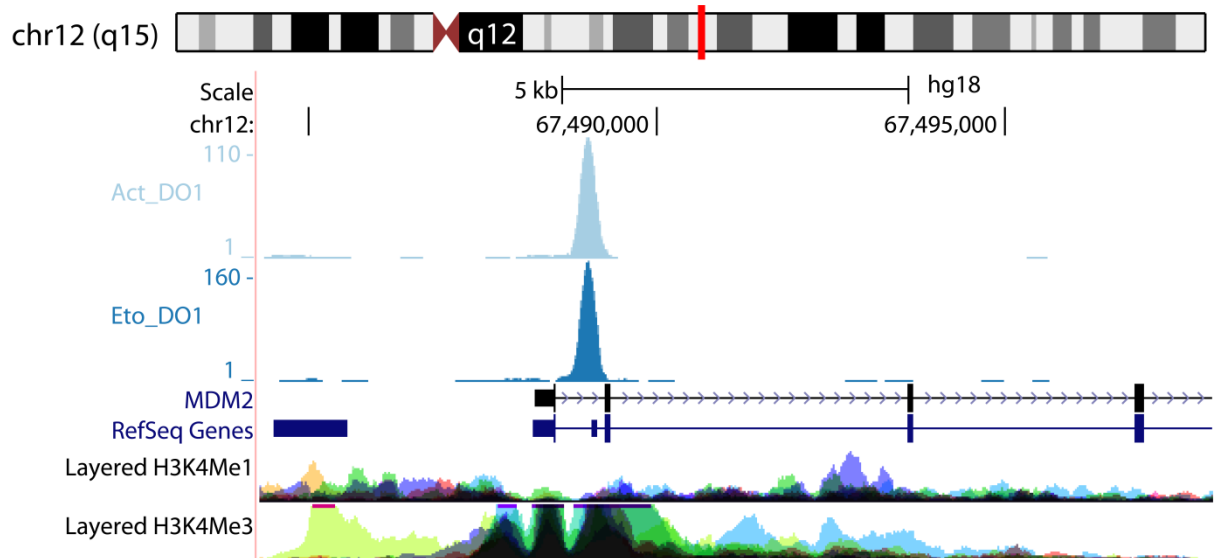
MDM2

Abbildung 14. Genomewide ChIP-Seq-Analyse bekannter Bindestellen von p53.

Dargestellt ist eine ChIP-Seq-Analyse (U2OS-Zellen) die die genomische Bindung von p53 an die Promotorabschnitte der Gene *MDM2*, *CDKN1A* und *BAX* zeigt. Die Sequenzierungsdaten wurden mittels UCSC Genome Browser visualisiert und charakterisiert.

Dargestellt ist die Visualisierung der *in vivo* p53-Bindeprofile an die Targetgene *MDM2*, *CDKN1A* und *BAX*. Die Analyse der p53 Bindestellen zeigt eine Bindung des Transkriptionsfaktors im Bereich der Promotoren und des Weiteren eine Bindung im nicht-kodierenden Bereich (Intron) der *CDKN1A* Sequenz.

3.3.2 Identifizierung von *ALOX5* als potenzielles Targetgen von p53

Anhand des Bindeprofils durch die genomweite Identifizierung der ChIP-Seq-Daten, konnte in dieser Arbeit erstmals die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Bereich der IntronG Sequenz des Targetgens *ALOX5* bestätigt und *in vivo* gezeigt werden. Das Gen *ALOX5* ist auf dem Chromosom 10q11.21 lokalisiert und setzt sich aus 14 Exons und 13 Introns zusammen. Dargestellt ist der Bereich der Bindung von p53 durch einen Pfeil (rot).

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden kommerziell zur Verfügung stehende Antikörper, die gegen p53 gerichtete sind, eingesetzt (DO-1, p53-pS46, p53-AcK320 und p53-AcK-382). Dargestellt ist die Bindung von p53 an den nicht-kodierenden Bereich der IntronG Sequenz. Die charakterisierte Bindungsregion von p53 an das Gen befindet sich „downstream“ des Promotorbereiches zwischen dem Exon 7 und 8 im Enhancer- und Promotor-Assoziierten Histon Bereich (H3K4Me1).

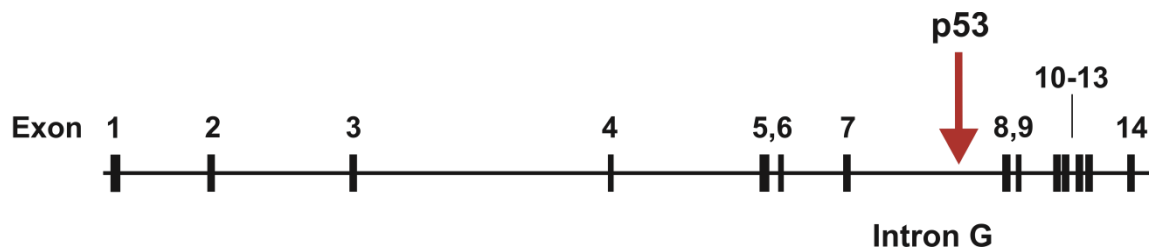
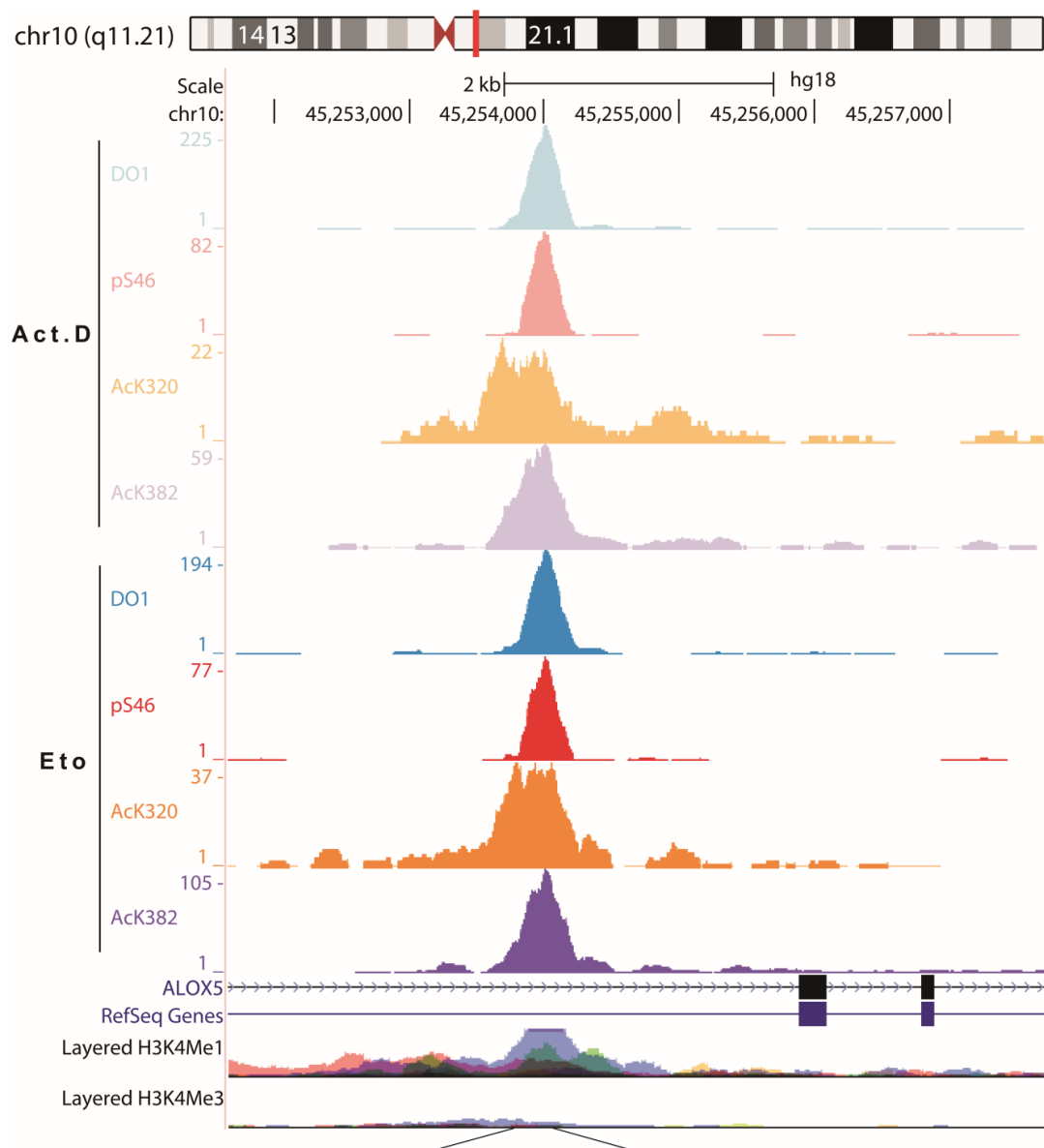


Abbildung 15. Strukturaufbau des *ALOX5*-Gens.

Darstellung des Gens *ALOX5* ist auf dem Chromosom 10q11.21. Das Gen setzt sich aus 14 Exons und 13 Introns zusammen. Der rot markierte Bereich stellt den Bereich der Bindung von p53 dar.

A



B

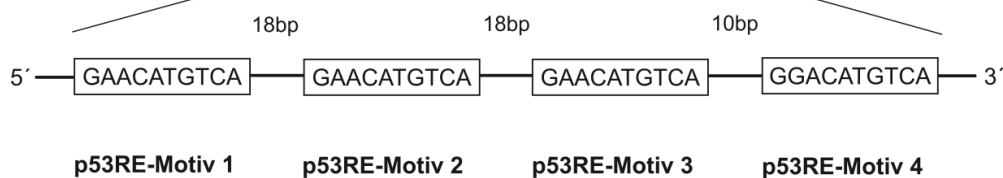


Abbildung 16. Genomweite ChIP-Seq-Analyse von p53 an die Bindesequenz von *ALOX5*.

Dargestellt ist eine ChIP-Seq-Analyse, die die genomische Bindung von p53 an die IntronG-Sequenz des Gens *ALOX5* zeigt (A). Die Sequenzierungsdaten wurden mittels UCSC Genome Browser visualisiert und charakterisiert. Die ChIP-Analyse erfolgte unter Verwendung verschiedener Antikörper (DO-1), p53-pS46, p53-AcK320 und p53-AcK382. Die Normierung der Amplifikation wurde auf den Input bezogen. (B) p53 Konsensus-Bindestellen (4 x RRRCWWGYYY mit 0-18 bp Spacer [R = Purin, W = A oder T und Y = Pyrimidin]) innerhalb der IntronG Sequenz.

Wie die in Abbildung 16 dargestellten ChIP-Seq-Ergebnisse zeigen, wurden eine Bindung des Transkriptionsfaktors an das Gen *ALOX5* nachgewiesen. Diese Bindung konnte unter Verwendung von den vier Antikörpern, welche sich gegen verschiedene posttranslationale Modifikationen gegen p53 richten, erzielt werden. Des Weiteren konnte innerhalb der IntronG Sequenz eine konservierte p53 Bindungsstelle, bestehend aus vier Kopien der palindromischen Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' welche durch kleine Spacer (0-18 bp) separiert werden, nachgewiesen werden.

Nach genotoxischem Stress wie Act.D oder Eto kommt es zu einer Akkumulierung und einer darauffolgenden Aktivierung durch post-translational Modifikation des Transkriptionsfaktors p53. Dieser bindet über eine p53-Konsensussequenz [73] an die Promotorregion oder Intronsequenz des jeweiligen Targetgens, um dann als Transkriptions-faktor zu fungieren.

3.3.3 Chromatin-Immunopräzipitation zur Quantifizierung von Protein-DNA-Komplexen

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte die Validierung der Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die bereits analysierten Zielsequenzen. Für die Immunopräzipitation der fixierten Protein-DNA-Komplexe wurden die Antikörper α -Maus-p53 (DO-1) und α -Maus-p53-AcK320 eingesetzt. Als Kontroll-Antikörper für unspezifische Bindung wurde ein α -Maus-IgG Antikörper verwendet. Bei den gewählten, speziellen Primer wurde darauf geachtet, dass die Amplikongröße in einem Bereich von ≤ 150 bp liegt, um diese in der RT-qPCR einsetzen zu können. Zur Normalisierung der amplifizierten Fragmente wurde für alle Ansätze der Input mitgeführt. Als Kontrollregion wurde ein nicht regulatorischer DNA-Bereich (Gen Myoglobin) gewählt.

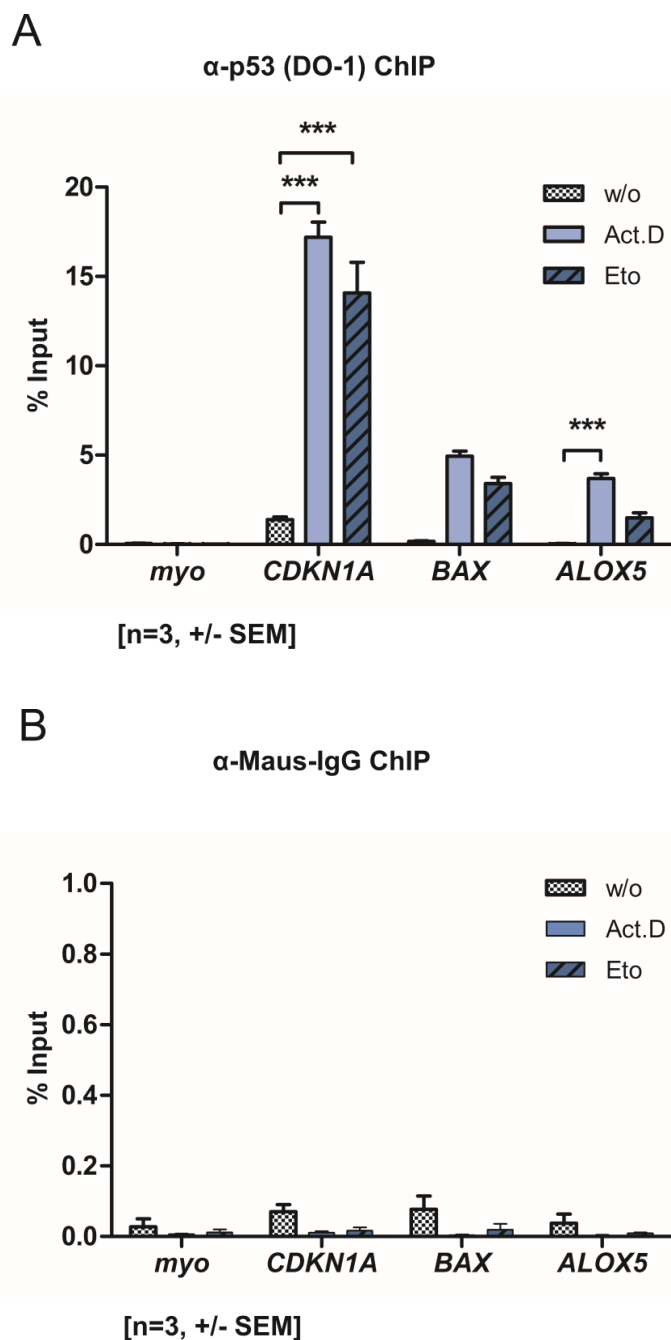


Abbildung 17. Chromatin-Immunopräzipitation für p53-DO-1.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 24 h behandelt, mit 1% Formaldehyd-Lsg. fixiert und anschließend lysiert. Die Präzipitation erfolgte mit den Antikörpern gegen p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000) (A) oder IgG (α -Maus-IgG) (B). Die geChIPte DNA wurde mittels RT-qPCR amplifiziert und analysiert. Die verwendeten Primerpaare binden bei *CDKN1A* und *BAX* jeweils im Promotorbereich, wohingegen die Primer gegen *ALOX5* im Intron-G binden. Als interne Negativkontrolle diente das Gen Myoglobin (myo). Es wurden jeweils die Änderungen der %-Input-Werte (Prozent der eingesetzten DNA) berechnet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente, (***) $p < 0,001$ Act.D/Eto vs. unbehandelte U2OS-Zellen).

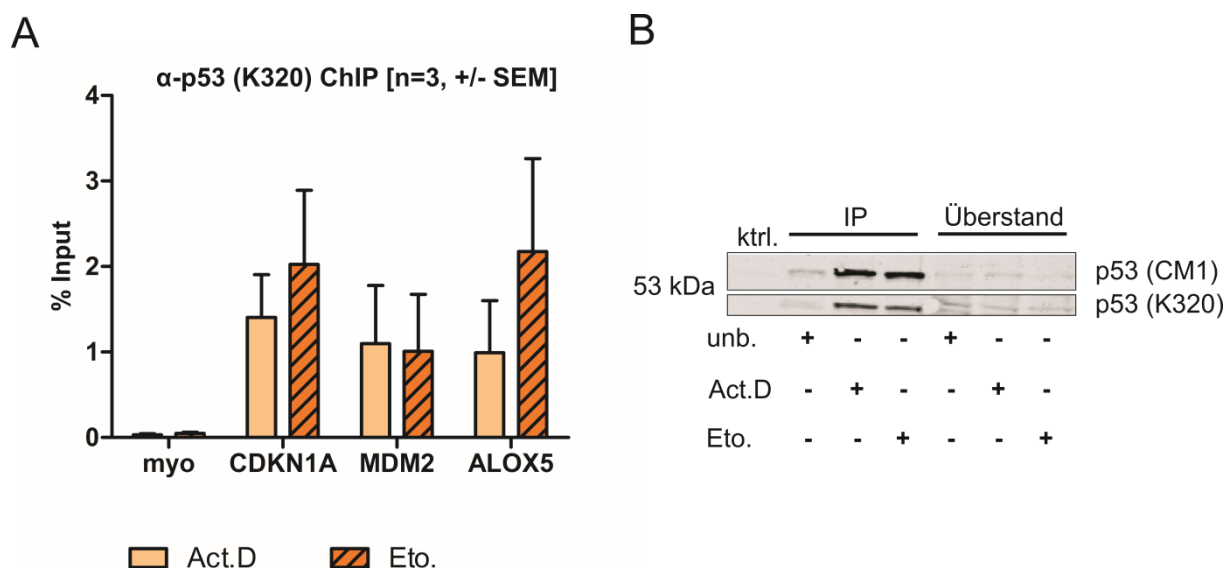


Abbildung 18. Chromatin-Immunopräzipitation für p53-K320.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 24 Stunden behandelt, mit 1% Formaldehyd-Lsg. fixiert und anschließend lysiert. Die Präzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen p53 (α -p53-K320) (A). Die geChIPte DNA wurde mittels RT-qPCR amplifiziert und analysiert. Die verwendeten Primerpaare binden bei *CDKN1A* und *MDM2* jeweils im Promotorbereich, wohingegen die Primer gegen *ALOX5* im Intron-G binden. Als interne Negativkontrolle diente das Gen Myoglobin (myo). Es wurden jeweils die Änderungen der %-Input-Werte (Prozent der eingesetzten DNA) berechnet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. (B) U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 24 Stunden behandelt und anschließend lysiert. Für die Präzipitation mit dem Antikörper gegen acetyliertes p53 (α -p53-K320, Millipore, 1:500) wurden 250 μ g Gesamtprotein aus Zelllysaten eingesetzt und anschließend mittels Western Blot analysiert.

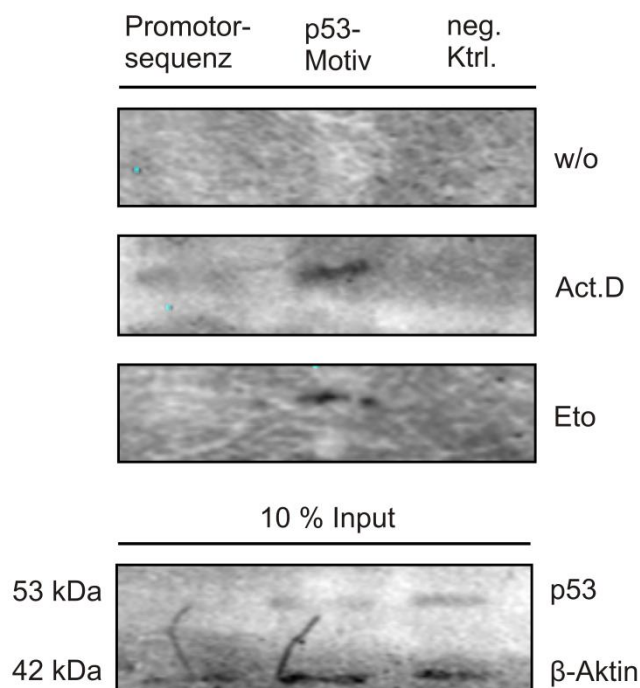
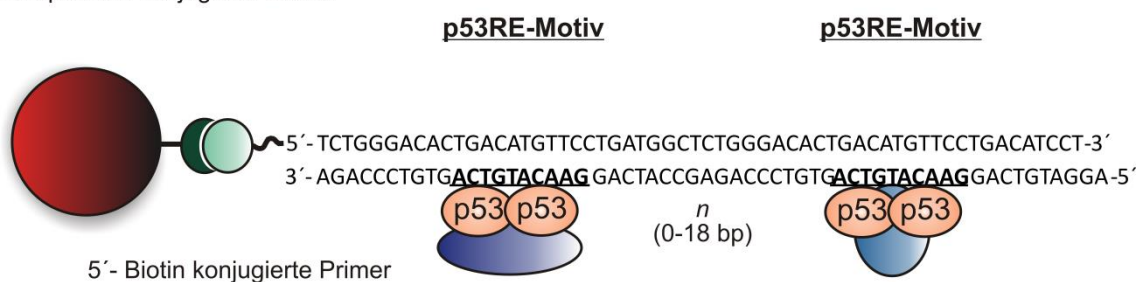
Bei der Identifizierung der Zielsequenz *ALOX5* wurden geChIPte DNA-Proben sowie die Input-Kontrollen mittels ChIP-RT-qPCR analysiert. Die RT-qPCR internen Negativkontrolle Myoglobin zeigte wie erwartet keine spezifischen Produkte bei der Amplifikation. *CDKN1A*, *MDM2* und *BAX* zeigten als eingesetzte Positivkontrollen eine erhöhte Amplifikation sowohl nach Act.D als auch nach Eto Behandlung. Dieses Ergebnis bestätigt die chromosomale Binding und transkriptionelle Regulation der besagten Targetgene durch den Transkriptionsfaktor p53. Ebenso konnte eine starke und signifikante Bindung von p53 an dem Targetgen *ALOX5* nachgewiesen werden. Auch hier ist eine erhöhte Amplifikation nach beiden Behandlungen zu beobachten. Die Quantifizierung der ChIP-Daten lieferte somit den Beweis einer Bindung von p53 zu den zuvor ermittelten ChIP-Seq-Daten.

3.3.4 Quantifizierung der Protein-DNA-Komplexbildung mittels Oligo-Pull-Down-Assay

Nach der Identifizierung von p53 als Transkriptionsfaktor des Gens *ALOX5*, wurde als nächstes die räumliche Orientierung des Transkriptionsverstärkers – Enhancers zur Promotorsequenz mittels Oligo-Pull-Down-Assay analysiert. Nach der Inkubation mit den Ganzzelextrakten aus U2OS-Zellen wurden die Oligonukleotide durch die 5'-Biotinmarkierung isoliert, die gebundenen p53-Proteinkomplexe eluiert und mittels Western Blot Analyse quantifiziert. Um eine Interaktion zwischen p53 und der *ALOX5*-Promotorsequenz zu untersuchen, wurde der Sequenzabschnitt mit der potenziellen Sp1-Bindestelle untersucht. Als Negativkontrolle diente eine unspezifische DNA-Sequenz.

In Abbildung 19 konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor p53 nach Behandlung mit den entsprechenden Zytostatika von den sequenzspezifischen Oligonukleotiden eluiert und mit einem α -p53 Antikörper in der Western Blot Analyse detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu, konnte nur eine leichte Bindung von p53 nach der Behandlung mit Act.D an die proximale Promotorsequenz von *ALOX5* nachgewiesen werden. Die unspezifischen DNA-Oligonukleotide zeigten wie erwartet keine spezifische Bindung von p53 an die unspezifische DNA-Sequenz.

Streptavidin konjugierte Beads

**Abbildung 19. Oligo-Pulldown-Assay.**

Schema eines Pulldown – Assays. Immobilisierte Streptavidin-Dynabeads® wurden an biotinylierte, sequenzspezifische Primer, mit den jeweiligen Konsensussequenzen von p53 (siehe Tabelle 16), konjugiert und anschließend mit 500 µg Gesamtprotein aus U2OS-Zellen inkubiert. Eluiertes p53 welches an die Oligonukleotidssequenzen gebundenen hat, wurden mittels Western Blot analysiert (α-Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Positivkontrolle dient die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 in der *ALOX5*-Promotorsequenz. Als Negativkontrolle dient eine unspezifische DNA-Sequenz (siehe Tabelle 23).

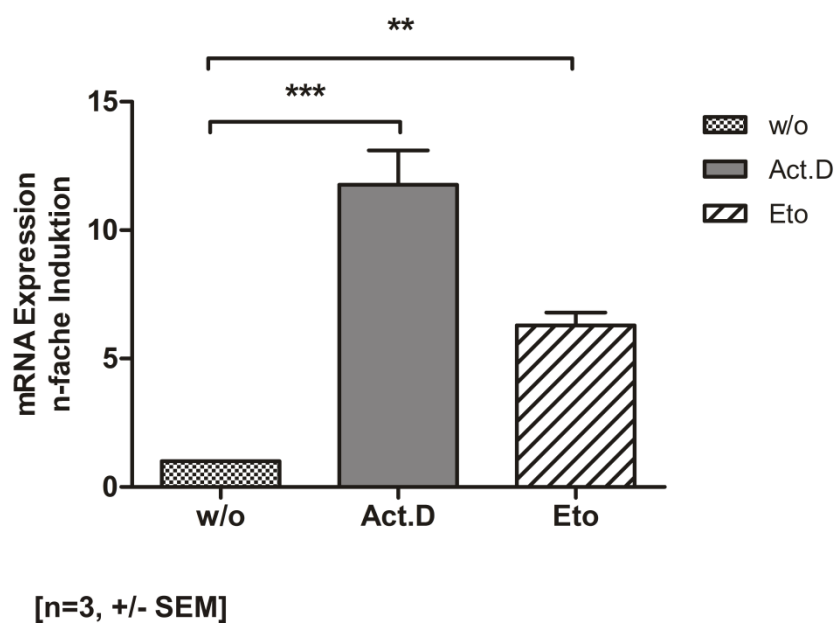
3.4 p53 vermittelte Expression von *ALOX5* beziehungsweise der humanen 5-Lipoxygenase

3.4.1 5-L0-Expressionsanalyse in p53-Wildtyp-Zellen

Um die p53-abhängige 5-L0-Expression zu untersuchen, wurde die Regulation der Expression von Zellen mit und ohne Zytostatika Behandlung nach 24 Stunden verglichen. Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien U2OS und MCF7 verwendet, die endogenes wtp53 exprimieren. Die Transkriptmenge von *ALOX5* wurde nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels RT-qPCR quantifiziert. Als Referenzgen diente *HPRT1*.

A

ALOX5-Expression in U2OS-Zellen



B

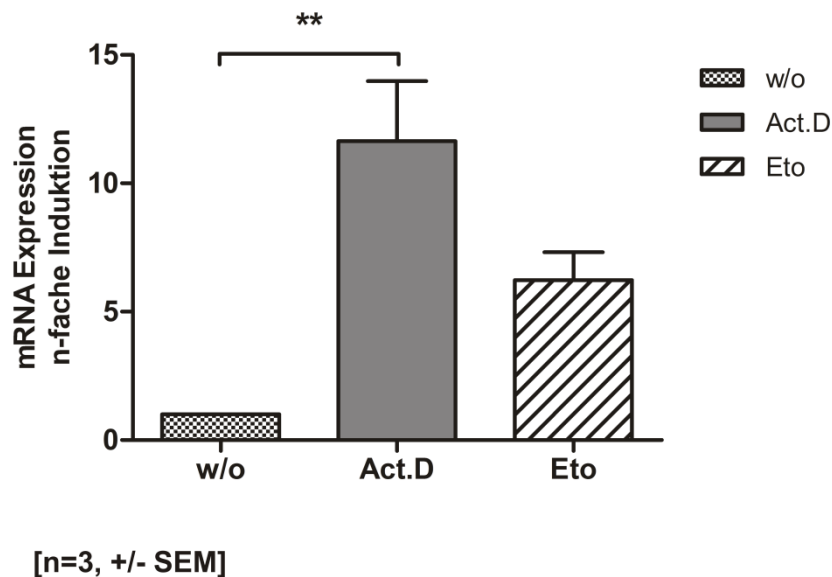
***ALOX5*-Expression in MCF7-Zellen**

Abbildung 20. Expression von *ALOX5* in U2OS- und MCF7-Zellen.

RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5*. Untersucht wurden die p53-Wildtyp-exprimierenden Zelllinien U2OS (A) und MCF7 (B). Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert. Die Darstellung zeigt die Induktion von *ALOX5* bezogen auf unbehandelte Zellen. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente, ***p < 0,001 verglichen mit den unbehandelten Zellen.

Die Expressionsanalyse von *ALOX5* zeigt eine deutliche und signifikante Induktion der Expression nach Behandlung mit den jeweiligen Zytostatika. Sowohl in U2OS als auch in MFC7 konnte eine 12-fache Induktion des Gens nach Act.D Behandlung nachgewiesen werden, ***p < 0,001 (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Ebenso konnte ein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge in Eto behandelten Zellen beobachtet werden, **p < 0,01 (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test).

Des Weiteren wurde die signifikante Veränderung der Expression von *ALOX5* auf Proteinebene im Western Blot analysiert. Dazu wurden Ganzzelextrakte von U2OS- und MCF7-Zellen extrahiert. 48 Stunden nach Induktion mit Act.D oder Eto wurde die Proteinkonzentration von p53 und 5-LO im Verhältnis zu unbehandelten Zellen verglichen. Als Referenzgen diente β -Aktin.

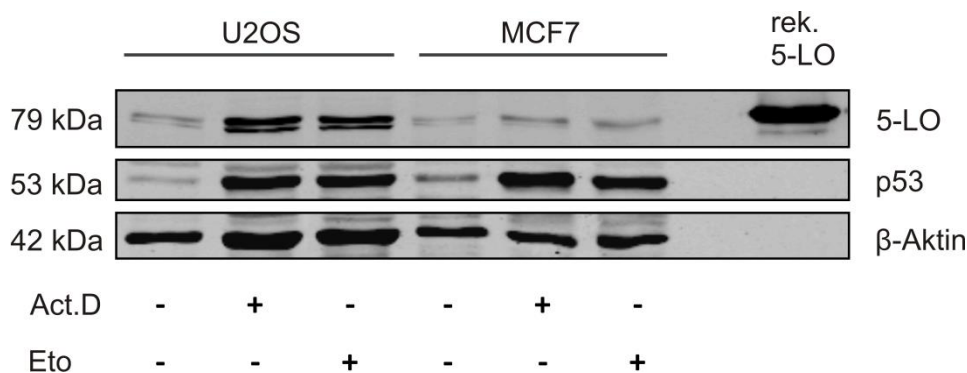


Abbildung 21. Western Blot Analyse des 5-LO-Proteins in U2OS- und MCF7-Zellen.

Die Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 48 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000) und von p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle dient β -Aktin und als Positivkontrolle rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

Abbildung 21 zeigt eine repräsentative Western Blot Analyse der Proteinlevel p53 und 5-LO. Deutlich zu erkennen ist die steigende Expression der beiden Proteine nach 48 Stunden Behandlungsdauer. Im Gegensatz dazu zeigten unstimulierte Zellen nur einen geringfügigen basalen Level der Proteine. Die Induktion der humanen 5-LO ist in den U2OS-Zellen deutlicher zu beobachten wie in den MCF7-Zellen, was eine erhöhte Translationsrate vermuten lässt.

Um den genauen Zeitpunkt der Regulation der 5-LO in Abhängigkeit der p53-Proteinmenge zu untersuchen, wurden Ganzzellextrakte zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Nach Induktion mit Act.D oder Eto wurde die Proteinkonzentration von p53 und 5-LO im Verhältnis zu unbehandelten Zellen verglichen. Als Referenzgen diente β -Aktin.

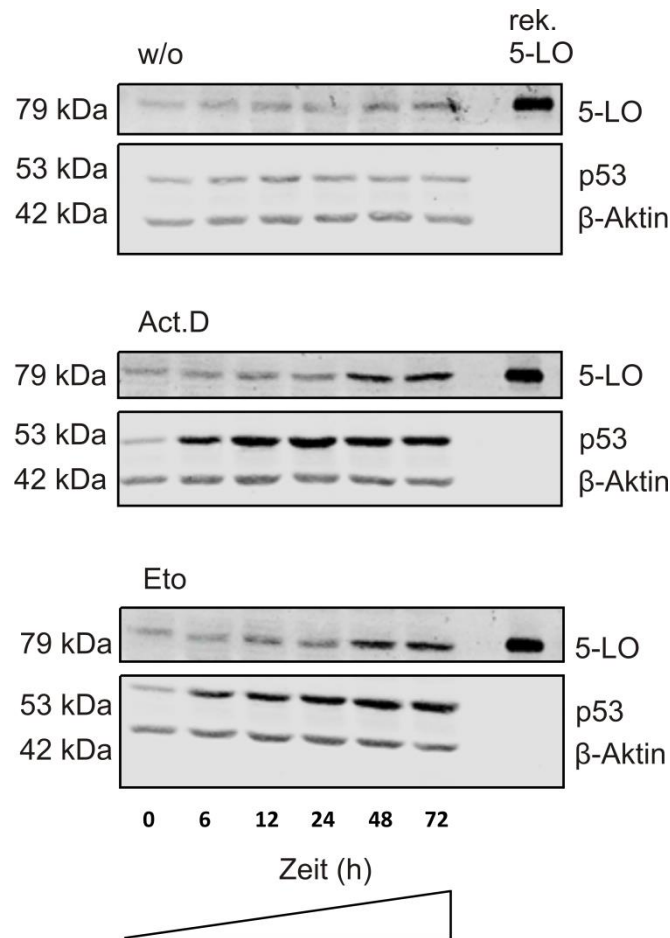


Abbildung 22. Zeitvermittelte 5-LO-Expression in U2OS-Zellen.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach den jeweiligen Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000) zeitabhängig von der Expression von p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle dient β -Aktin und als Positivkontrolle rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

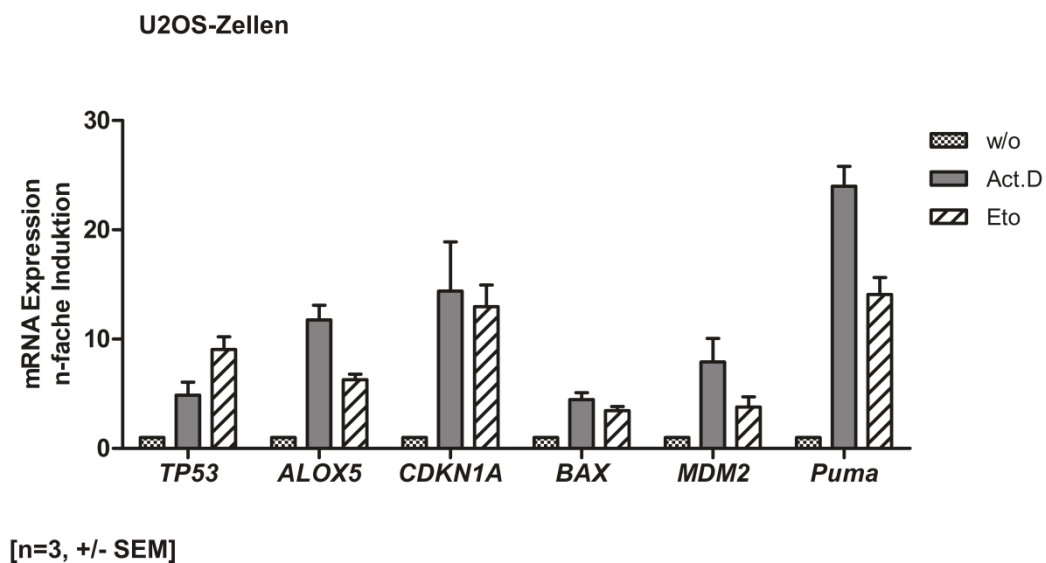
Die Western Blot Analyse zeigte, dass es bereits 6 Stunden nach der Behandlung zu einer autoregulatorischen Hochregulierung der endogenen p53-Proteinmenge kam. Die p53-Expression nimmt kontinuierlich zu und ist über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden nachweisbar. Zum Zeitpunkt 0, 6, 12 und 24 Stunden war die Proteinkonzentration von 5-LO in behandelten Zellen noch stark reduziert. Erst mit steigendem p53 Proteinlevel kommt es zu einer zeitabhängigen Expression der humanen 5-LO. Die stärkste Induktion bzw. Proteinlevel zeigt sich nach 48 und 72 Stunden. Im Vergleich dazu zeigten Kontrollzellen, die keiner Behandlung unterzogen wurden, keine Veränderung im Expressionsmuster von p53 oder 5-LO. Damit

konnte bewiesen werden, dass die Expression und Proteinkonzentration der 5-LO mit der Aktivierung und Akkumulierung von wtp53 korreliert.

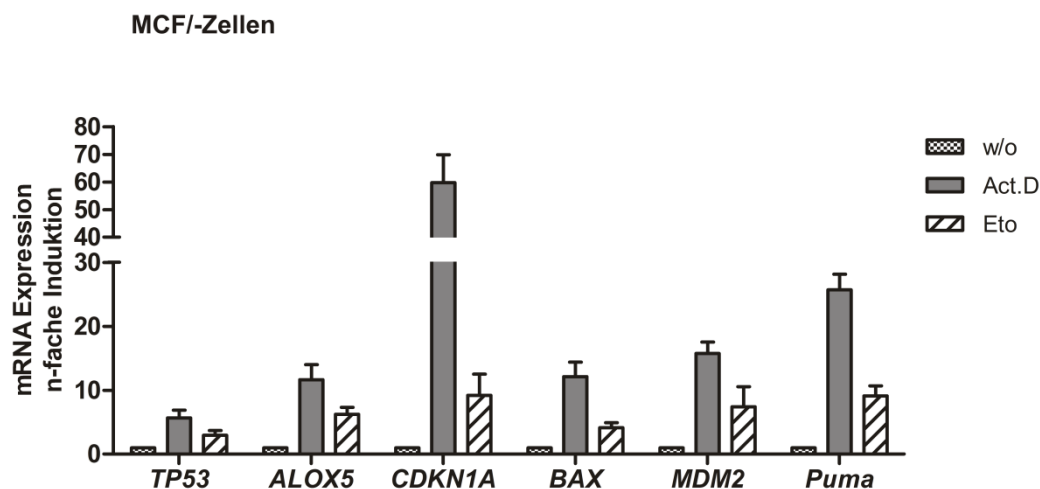
3.4.2 p53-abhängige Transaktivierung endogener Targetgene

Nachdem die Expressionsanalyse von *ALOX5* eine deutliche und signifikante Induktion der Expression nach Behandlung mit den jeweiligen Zytostatika zeigte, wurde die Änderung der Transkriptmenge p53-regulierter Gene untersucht. Für diese Untersuchungen wurden die humanen Zelllinien U2OS, MCF7 und HCT116p53^{+/+} verwendet, die endogenes wtp53 exprimieren. Dazu wurde die Expression von *TP53*, *ALOX5*, *CDKN1A* (p21), *BAX*, *MDM2* und Puma nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels RT-qPCR quantifiziert. Als Referenzgen diente *HPRT1*.

A

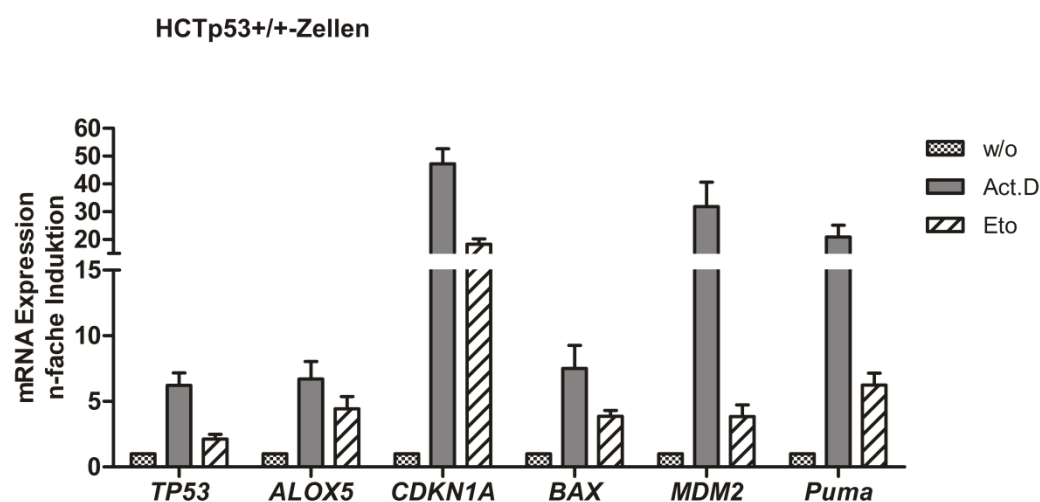


B



C

[n=3, +/- SEM]



[n=3, +/- SEM]

Abbildung 23. Expressionsanalysen in p53-Wildtyp-exprimierenden Zellen.

Dargestellt sind die RT-qPCR-Analysen der Expression von *ALOX5* im Vergleich zu bekannten Targetgenen die von p53 reguliert werden. Untersucht wurden die p53-Wildtyp exprimierenden Zelllinien U2OS (A), MCF7 (B) und HCT116p53^{+/+} (C). Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert. Die Darstellung zeigt die Induktion der Targetgene bezogen auf unbehandelte Zellen. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Wie erwartet zeigte die durch genotoxischen Stress induzierte Akkumulation des wtp53 Proteins eine Transaktivierung endogener Targetgene. Die Induktion von wtp53 führt zu

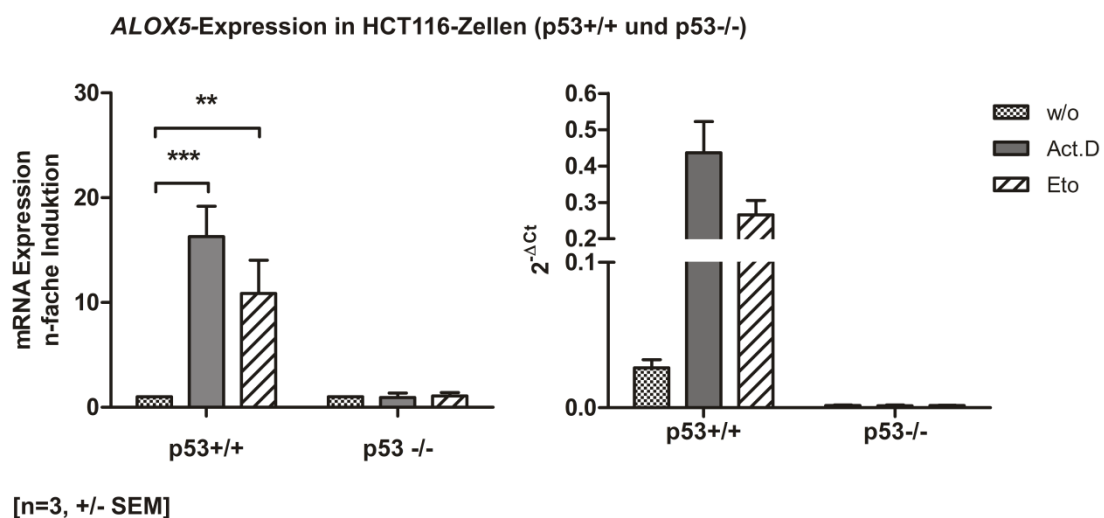
einer deutlichen Hochregulation der Transkriptmenge der endogenen p53-regulierten Targetgene *ALOX5*, *CDKN1A* (p21), *BAX*, *MDM2* und *PUMA*. Zusammenfassend zeigte die Expressionsanalysen, dass die Akkumulation des wtp53 Proteins durch die Zytostatika Act.D und Eto für die Induktion endogener p53 Targetgene erforderlich ist.

3.4.3 Nachweis der p53-abhängigen *ALOX5*-Expression in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (HCT116)

Um einen direkten Vergleich in dem Expressionsmuster von *ALOX5* in Abhängigkeit zu dem p53 Status zu determinieren, wurde die Zelllinie HCT116 genauer untersucht. Hierbei wurde zum einen die p53 Wildtyp exprimierende Zelllinie HCT116p53^{+/+} und zum anderen die p53-„knockout“ Zelllinie HCT116p53^{-/-} direkt miteinander verglichen. Die jeweiligen Zellen wurden zum einen mit Act.D oder Eto behandelt und nach 24 bzw. 48 Stunden in einer Expressionsanalyse oder in einer Immundetektion untersucht.

Änderungen in der *ALOX5*-Transkriptmenge in den behandelten Zellen wurden relativ zu den unbehandelten Zellen mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) bestimmt. Als endogenes Kontrollgen dienten *HPRT1*. Als Kontrolle in der Immundetektion diente β -Aktin.

A



B

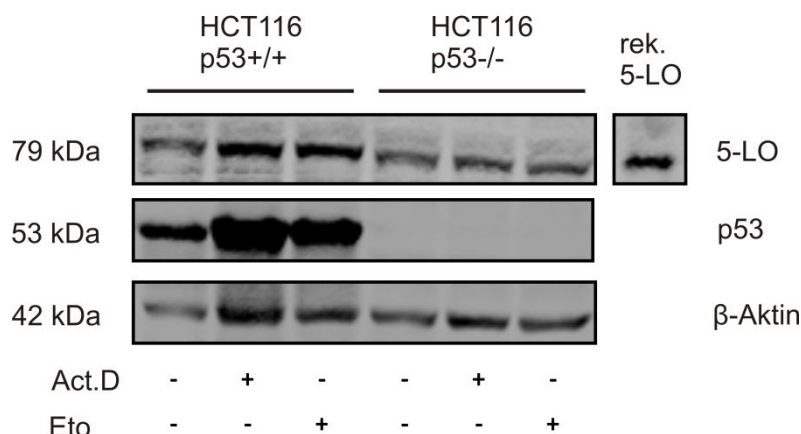


Abbildung 24. p53-Wildtyp-abhängige *ALOX5*-Expression in HCT116-Zellen.

(A) RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5*. Untersucht wurden die Zelllinien HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}. Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert. Die Expression von *ALOX5* wurde zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente, **p < 0,01; ***p < 0,001 (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test) verglichen mit den unbehandelten Zellen. (B) Die HCT116-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 48 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000) in Abhängigkeit von p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle diente β -Aktin und als Positivkontrolle rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

In der Expressionsanalyse zeigten die Zellen HCT116p53^{+/+}, im Gegensatz zu HCTp53^{-/-} Zellen, eine deutliche und signifikante Induktion der *ALOX5*-Transkripte. Hierbei konnte eine ≤ 15 -fache Induktion des Gens nach Act.D-Behandlung nachgewiesen werden, ***p < 0,001 (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Ebenso konnte ein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge in Eto behandelten Zellen ermittelt werden, **p < 0,01 (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Im Gegensatz dazu, konnte weder bei der Expressionsanalyse noch bei der Immundetektion eine Induktion bzw. Expression des Gens *ALOX5* in der „knockout“ Zelllinie HCT116p53^{-/-} nachgewiesen werden. Abbildung 24B zeigt eine repräsentative Western Blot Analyse, bei der eine deutliche Induktion der Proteinkonzentration von p53 und 5-LO in HCT116p53^{+/+} im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung in den HCT116p53^{-/-}-Zellen detektiert werden.

Um dieses Ergebnis noch weiter zu verdeutlichen, wurde die Änderung der Expression von *TP53*, *ALOX5* und *CDKN1A* (p21) nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels RT-qPCR quantifiziert und verglichen. Als Referenzgen diente *HPRT1*.

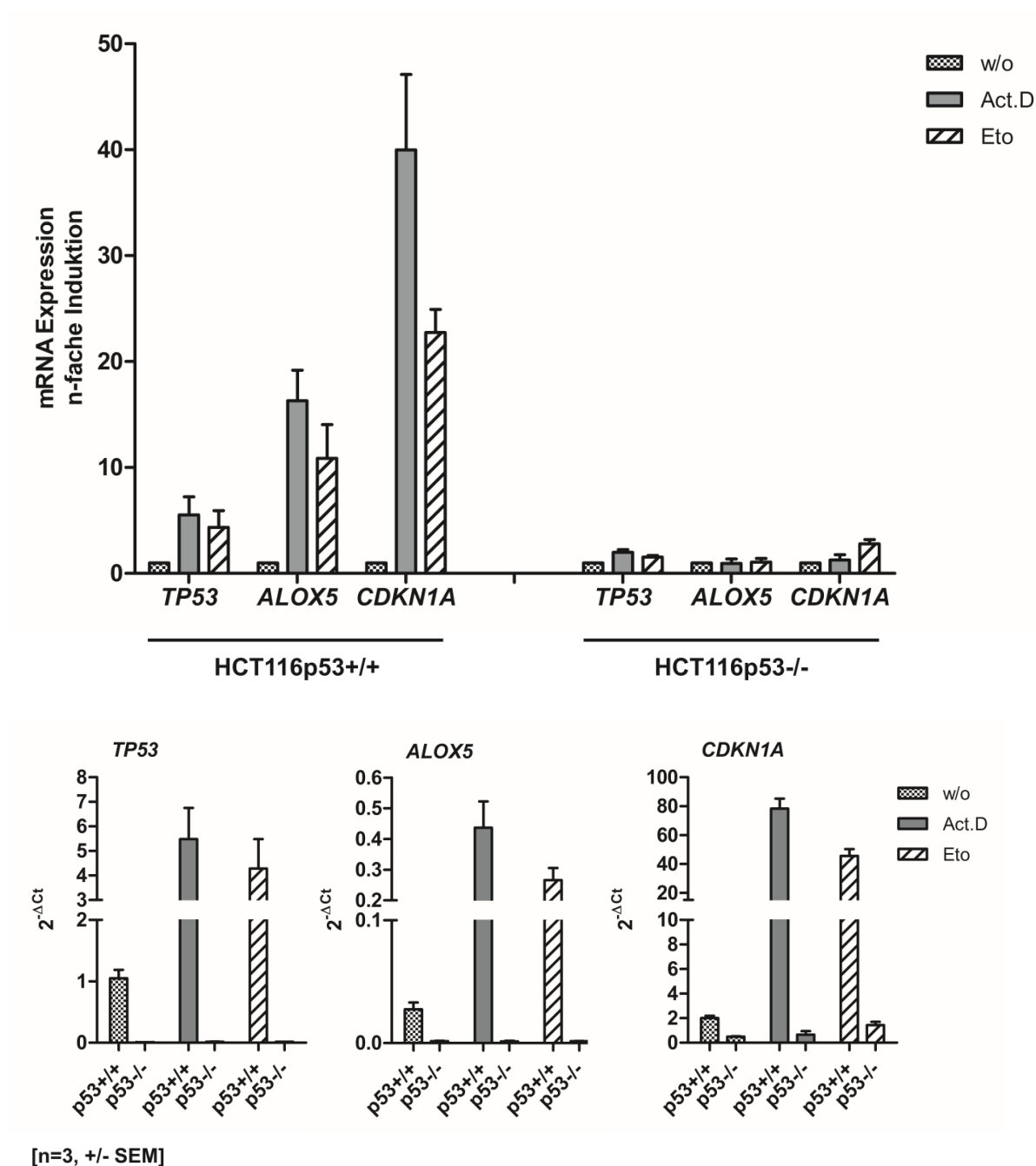


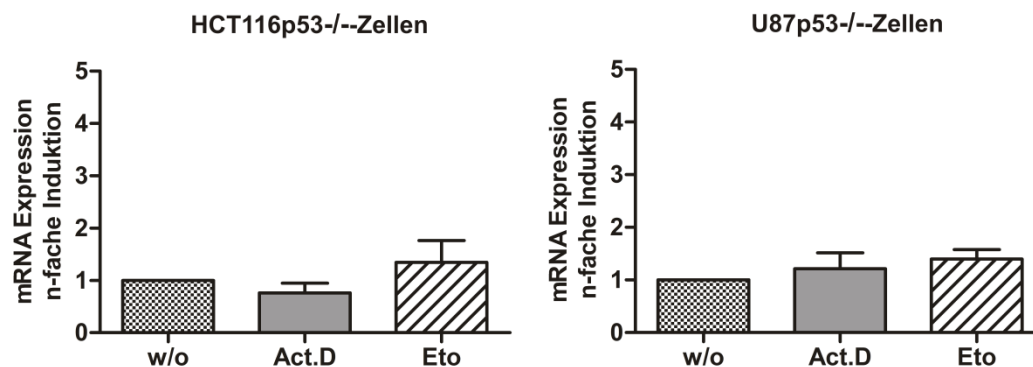
Abbildung 25. p53-Wildtyp-abhängige Expression in HCT116-Zellen.

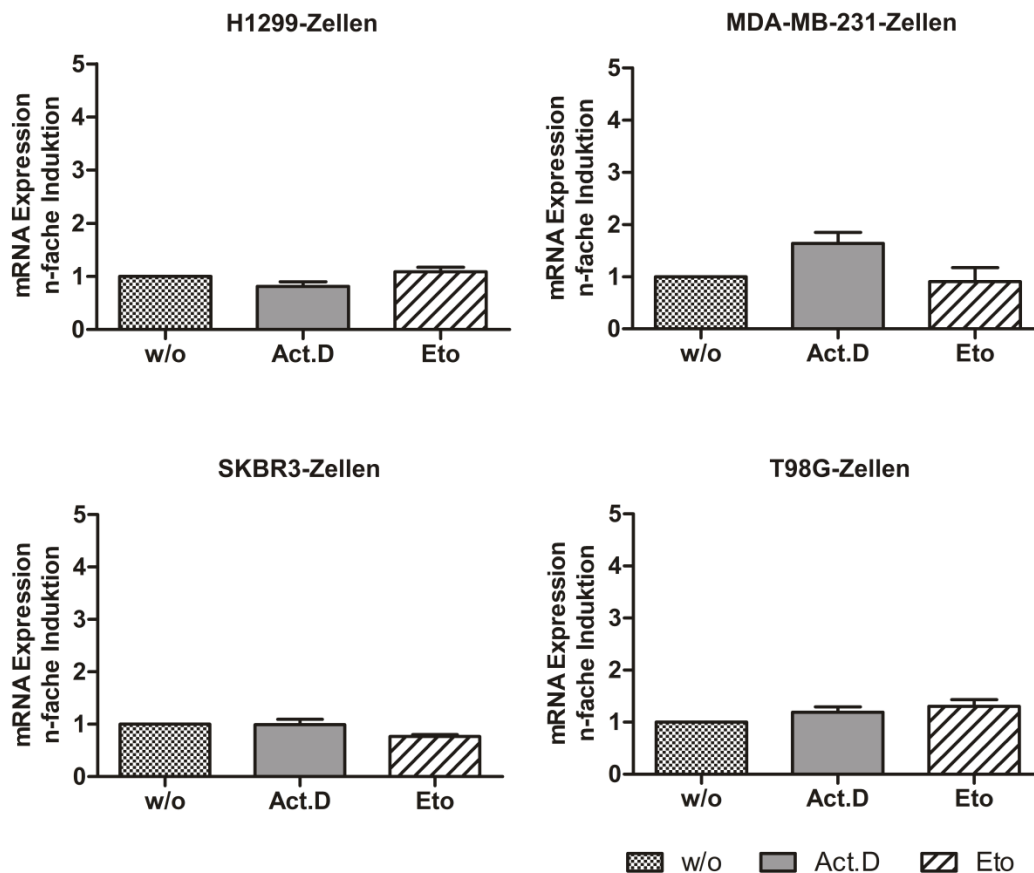
RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5* im Vergleich zu bekannten Targetgenen die von p53 reguliert werden. Untersucht wurden die Zelllinien HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}. Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert. Die Expression von *TP53*, *ALOX5* und *CDKN1A* wurde zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als 2^{-ΔCt}-Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Wie erwartet bestätigt die Expressionsanalyse die Annahme einer p53-vermittelten transkriptionellen Regulation. In den HCT116p53^{+/+}-Zellen ist eine deutliche Induktion der Targetgene *ALOX5* und *CDKN1A* zu sehen. Im Gegensatz zu Wildtyp-p53 exprimierenden Zelllinien zeigt sich keine Änderung in der Amplifikation der *ALOX5* Transkripte nach der jeweiligen Behandlung. Mit diesem Experiment wurde die Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors auf transkriptioneller Ebene bestätigt.

3.4.4 „Loss of function“ in p53-mutierten Zelllinien

Um zu untersuchen, inwieweit der Wildtyp-Status von p53 an der Expression der 5-LO beteiligt ist, wurden Expressionsanalysen mit Mutanten- oder p53-Null-Zelllinien durchgeführt. Bei den p53-Mutationen der jeweiligen Zelllinien handelt es sich um Punktmutationen die sich in der spezifischen DNA-Bindedomäne befinden, welche zu einem Verlust der p53-Funktion führen. Änderungen in der *ALOX5*-Transkriptmenge in den behandelten Zellen wurden relativ zu den unbehandelten Zellen mittels RT-qPCR bestimmt. Als endogenes Kontrollgen dienten *HPRT1*.





[n=3, +/- SEM]

Abbildung 26. RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5*.

Untersucht wurden die p53-Null (HCT116p53^{-/-}, U87p53^{-/-} und H1299) und p53-mutierte (MDAMB-231, SKBR-3 und T98G) Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μM Eto inkubiert. Die Darstellung zeigt die Induktion von *ALOX5* bezogen auf unbehandelte Zellen. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

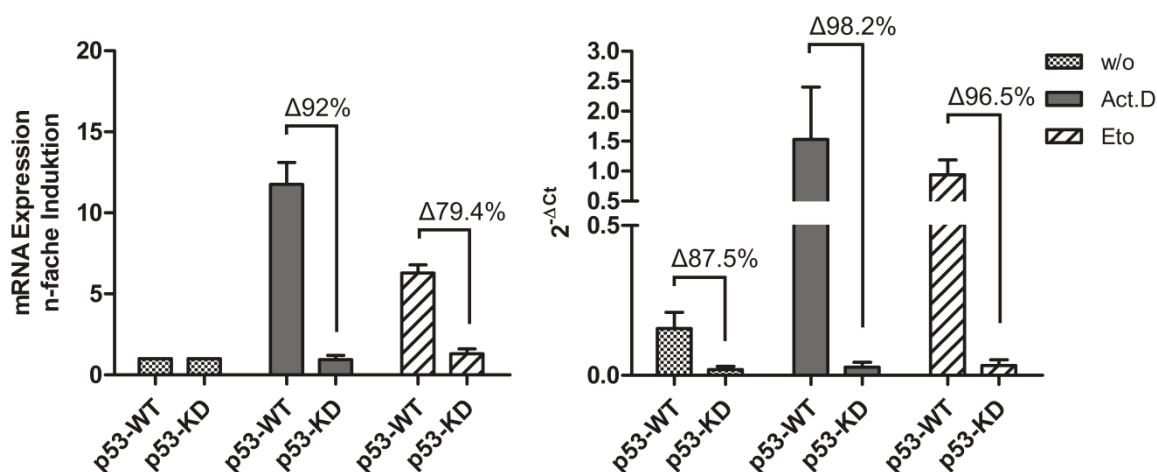
Im Gegensatz zu den Wildtyp-p53-exprimierenden Zelllinien U2OS, MCF7 und HCT116p53^{+/+} konnte in den p53-negativen und mutierten Zelllinien, nach Behandlung mit Act.D und Eto, keine Änderung der *ALOX5*-Expression festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die *ALOX5*-Expression in den Zelllinien auf einer p53-vermittelten transkriptionellen Ebene reguliert wird.

3.4.5 Validierung der p53-abhängigen Expression der 5-LO durch gezielten Knockdown von p53

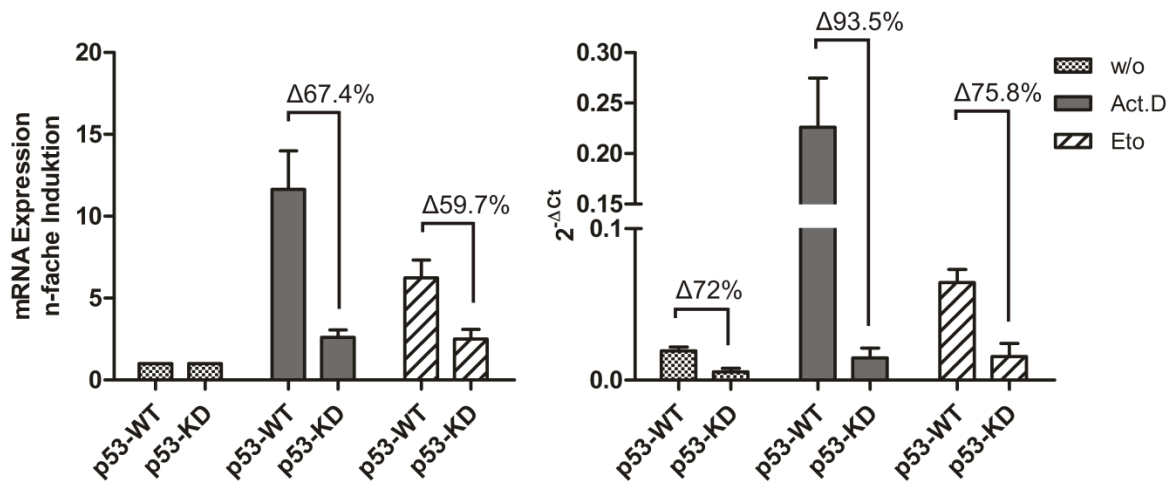
Um die Bedeutung der p53-vermittelten Expression der 5-LO zu verdeutlichen, wurden shRNA-Konstrukte gegen p53 verwendet. Hierbei wurden die Zelllinien U2OS und MCF7 stabil lentiviral infiziert und mittels Puromycin selektiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (pLKO.1-puro) verwendet. Die Effizienz der p53-shRNA wurde in den Zelllinien U2OS und MCF7 im Western Blot und in der Expressionsanalyse mittels RT-qPCR getestet.

A

ALOX5-Expression in p53-Knockdown U2OS-Zellen



B

ALOX5-Expression in p53-Knockdown MCF7-Zellen**Abbildung 27. ALOX5-Expression in p53-Knockdown-Zellen.**

RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5* in p53-Knockdown-Zellen. Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown von p53 (p53-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, p53-WT). Nach der Selektion wurden die U2OS- (A) und MCF7-Zellen (B) für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Die Expression von *ALOX5* wurde zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als 2^{-ΔCt}-Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Durch die shRNA-basierende p53-Suppression konnte eine deutliche Abnahme der *ALOX5*-Transkriptmenge beobachtet werden. Unbehandelte U2OS-Zellen zeigten eine Abnahme der *ALOX5*-Transkriptmenge von Δ87,5%. Nach Behandlung der Zellen mit Act.D bzw. Eto konnte eine noch effektivere Suppression der Transkriptmenge beobachtet werden. Für Act.D behandelte Zellen betrug diese Δ98,2% und für die Eto behandelten Zellen Δ96,5%. Ähnliche Ergebnisse wurden nach p53-Knockdown in MCF7-Zellen erzielt. Die Transkriptabnahme lag hier in unbehandelten MCF7-Zellen bei Δ72%. Nach Act.D-Behandlung betrug diese Δ93,5% und nach Eto-Behandlung Δ75,8%.

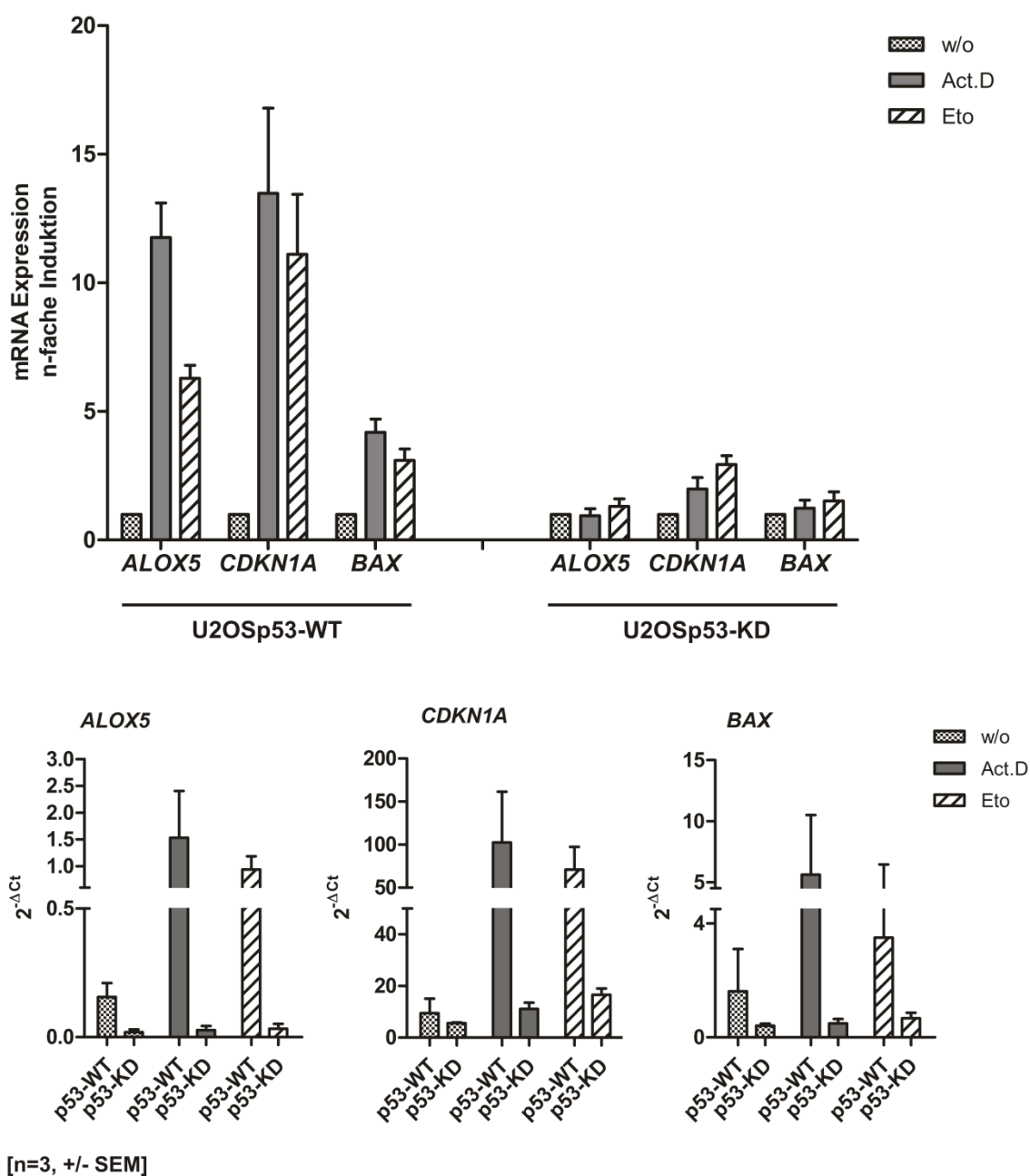


Abbildung 28. Änderung der Expression p53-regulierter Targetgene in p53-Knockdown-U2OS-Zellen.

RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5*, *CDKN1A* und *BAX* in U2OS-p53-Knockdown-Zellen. Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown von p53 (p53-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, p53-WT). Nach der Selektion wurden die U2OS-Zellen für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Die Darstellung zeigt die Expression von *ALOX5*, *CDKN1A* und *BAX* in p53-Wildtyp- (pLKO.1-puro, p53-WT) und in p53-Knockdown-Zellen (p53-KD). Die Expression der Targetgene wurde zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als 2^{-ΔCt}-Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Nachdem durch die Suppression von p53 mittels shRNA eine deutliche Abnahme der *ALOX5*-Transkription erzielt werden konnte, wurde im Vergleich die Änderung der Expression p53-regulierter Gene untersucht. Dazu wurde die Transkriptmenge von *ALOX5*, *CDKN1A* (p21) und *BAX* nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels RT-qPCR quantifiziert. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Des Weiteren wurde die Veränderung der Expression im Western Blot analysiert. Dazu wurden Ganzzelextrakte von U2OS-Zellen nach 24 und 48 Stunden extrahiert. Als Referenzgen diente β -Aktin.

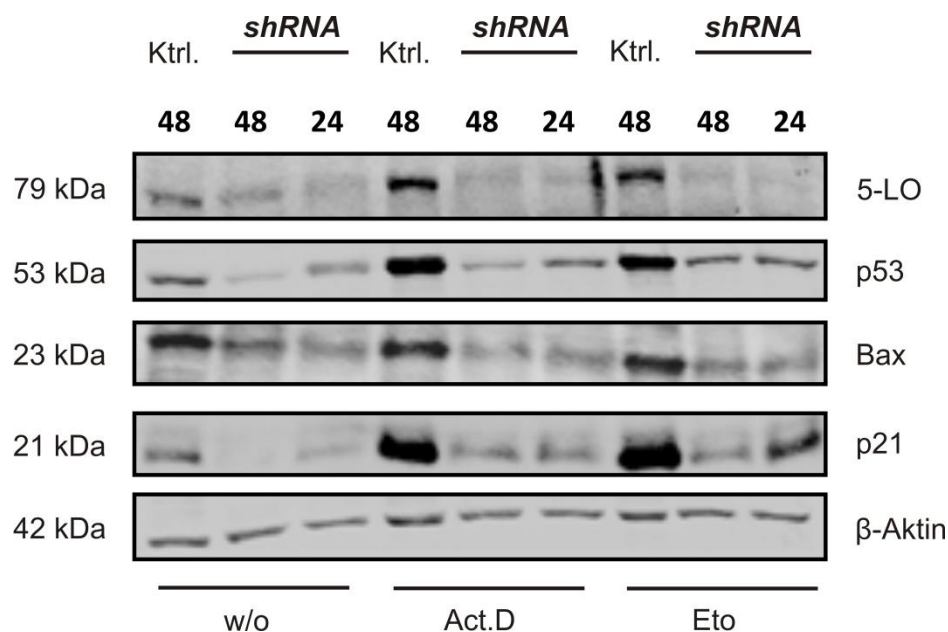


Abbildung 29. Western Blot Analyse des 5-LO-Proteins in p53-Knockdown-U2OS-Zellen.

Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 μ g/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown von p53 (p53-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, p53-WT). Nach der Selektion wurden die U2OS-Zellen für 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000), p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000), Bax (α -Maus-Bax, Santa Cruz, 1:200) und p21^{Waf1/Cip1} (α -Maus-p21, Cell Signaling, 1:2000). Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Wie erwartet zeigte sowohl die RT-qPCR-Analyse als auch die Proteinanalyse ähnliche Ergebnisse. Die shRNA-vermittelte p53-Suppression führte zu einer drastischen Abnahme der Transkriptmenge von *ALOX5* sowie der p53-regulierten Targetgene *CDKN1A* (p21) und *BAX*. Des Weiteren konnte eine p53-transkriptionelle Regulation der Targetgene auf

Proteinebene nachgewiesen werden. Mit diesen Experimenten konnte noch einmal die Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors p53 verdeutlicht werden.

3.5 5-LO-Aktivitätsassay in Zellhomogenaten nach Behandlung der Zellen mit Act.D und Eto

Die 5-LO katalysiert, als das zentrale Enzym des Leukotrienstoffwechsels, die Biosynthese von Leukotrien A₄ (LTA₄) aus Arachidonsäure (AA). Dies erfolgt in einer zweistufigen Redoxreaktion unter Mithilfe des FLAP-Proteins (Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein), wobei im ersten Schritt die AA zu 5(S)-Hydro(pero)xy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-H(p)ETE) oxidiert und im zweiten Schritt zu 5-HETE reduziert bzw. LTA₄ konvertiert wird. Aus dem Vorläufermolekül LTA₄ erfolgt, unter anderem, die Umsetzung zu dem pro-inflammatorischen Leukotrien LTB₄ und den Cysteinyl-Leukotrienen.

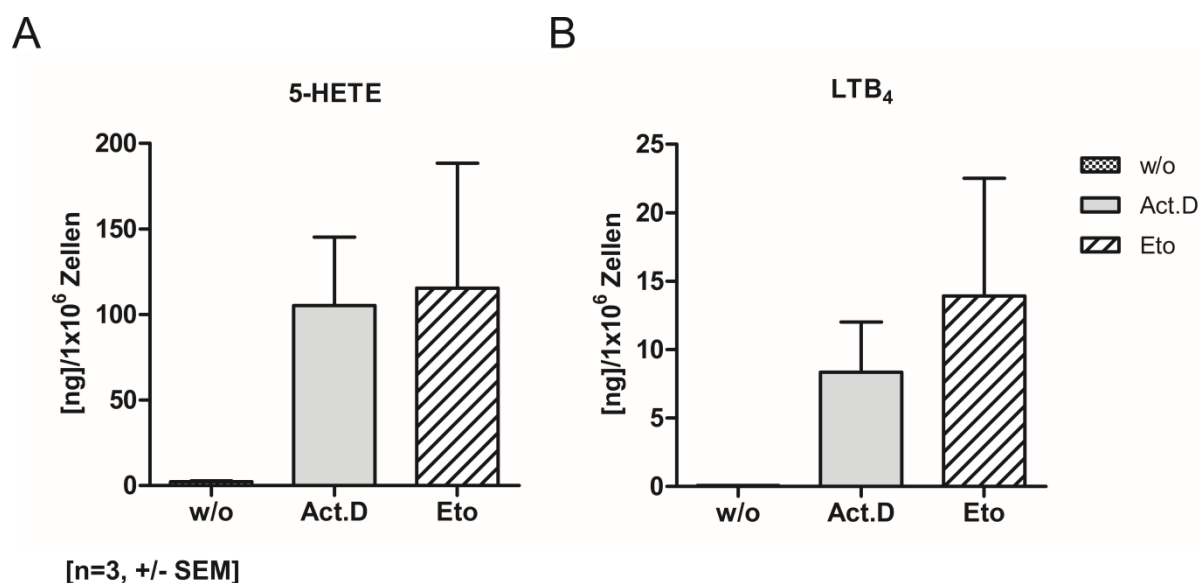


Abbildung 30. Bestimmung der 5-LO-Produktbildung in Zellhomogenaten.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μM Eto für 48 Stunden inkubiert. Die 5-LO-Aktivität ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die Homogenate wurden mit 1 mM ATP und 20 μM Arachidonsäure stimuliert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind die 5-LO-Produkte 5-HETE und LTB₄ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Nach Behandlung von U2OS-Zellen mit Act.D und Eto für 48 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen sowie deren Homogenisierung mittels Ultraschall. Durch Zugabe von 1 mM ATP und 20 μ M AA wurde die 5-LO Aktivität der Zellhomogenate ermittelt. Die Konzentrationen der Metabolite LTB₄ und 5-HETE in den Überständen wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, konnte nach Behandlung der U2OS-Zellen mit Act.D und Eto eine deutliche Zunahme der 5-LO-Aktivität beobachtet werden. Die Induktion von p53 durch genotoxischen Stress führt zu einer sichtbaren Induktion der 5-LO-Produkte 5-HETE und LTB₄ (pro 1 x 10⁶ Zellen). Auch die Erhöhung der 12-LO- und 15-LO-Produkte, 12-HETE und 15-HETE, konnte in den behandelten Zellen mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden.

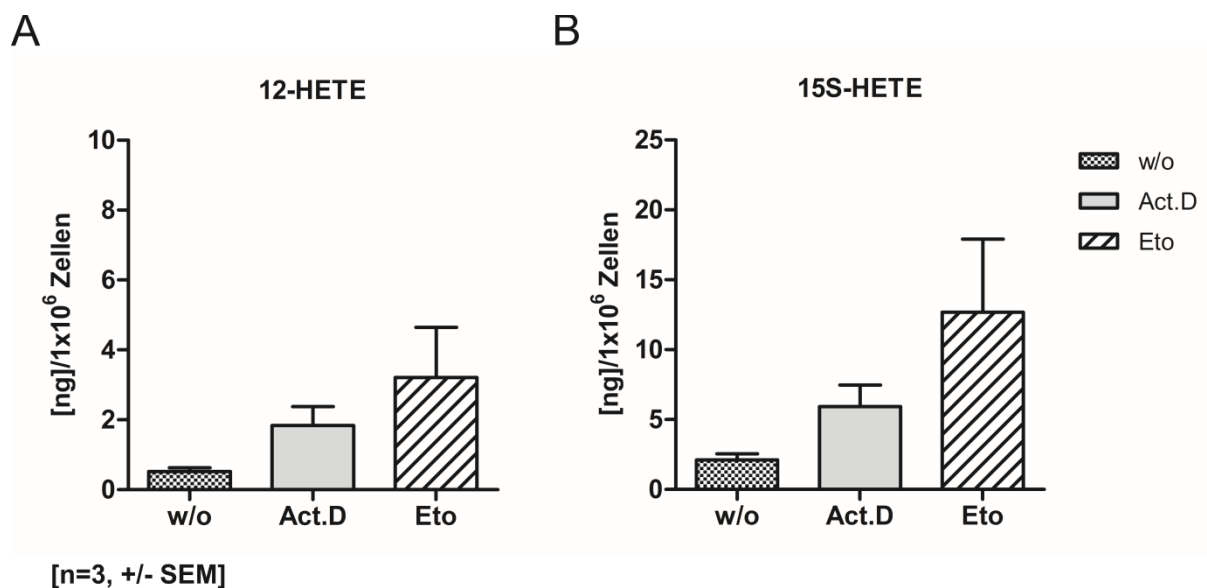


Abbildung 31. Bestimmung der 12- und 15-LO-Produktbildung in Zellhomogenaten.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 48 Stunden geerntet sowie homogenisiert. Die 12- und 15-LO Aktivität ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die Homogenate wurden mit 1 mM ATP und 20 μ M Arachidonsäure stimuliert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind die 12-LO- und 15-LO-Produkte 12-HETE (**A**) und 15-HETE (**B**) für drei voneinander unabhängige Experimente.

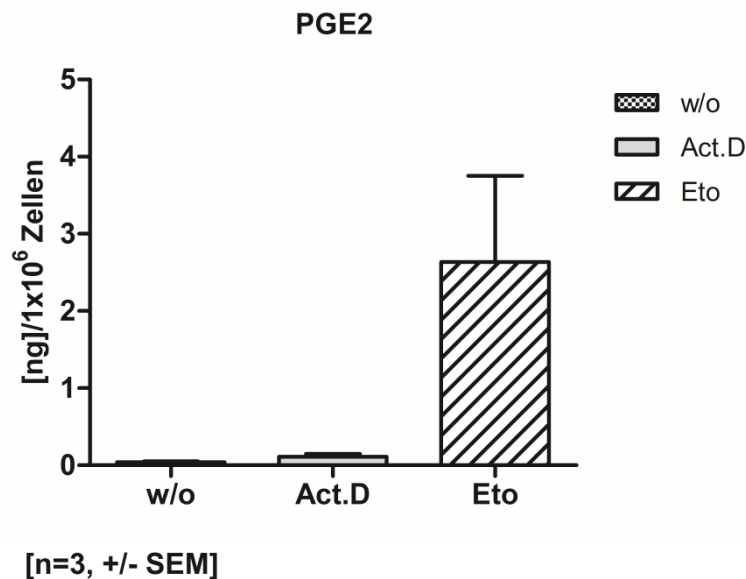


Abbildung 32. Bestimmung der COX-2-Aktivität in Zellhomogenaten.

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 48 Stunden geerntet sowie homogenisiert. Die COX-2-Aktivität ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die Homogenate wurden mit 1 mM ATP und 20 μ M Arachidonsäure stimuliert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind die ermittelten Konzentrationen für PGE₂ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Die LC-MS/MS wurde freundlicherweise von Carlo Angioni (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt

3.6 Reportergenanalysen zur Untersuchung der p53-Promotor-Enhancer-Aktivität

Die Bedeutung der p53-Konsensussequenz für die Aktivierung des proximalen *ALOX5*-Promotors wurde mittels Reportergen-Assay untersucht. Ausgehend von dem Vektorkonstrukt pN10 (*ALOX5*-Promotor) entstand durch Klonieren das Vektorkonstrukt pN10-IntronG-p53, das nun die Konsensussequenz für p53 enthält. Um die Einflüsse von p53 auf die proximale Promotorsequenz zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen Reportergenkonstrukten sowie mit den Expressionsplasmiden pCMX-p53wt (wildtyp p53) und pCMX-p53R273H (mutiertes p53) transient kotransfiziert. Mit Hilfe des Luciferase Assay Reporter Kit (Promega) wurde die relative Menge an aktiven Luciferase-Enzym anhand des emittierenden Lichts 40 Stunden nach Transfektion ermittelt (Dargestellt in RLU - Relative Light Units). Als Positivkontrolle wurde das

Luciferasekonstrukt Bax-Luc verwendet. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Khalil Ahmad durchgeführt.

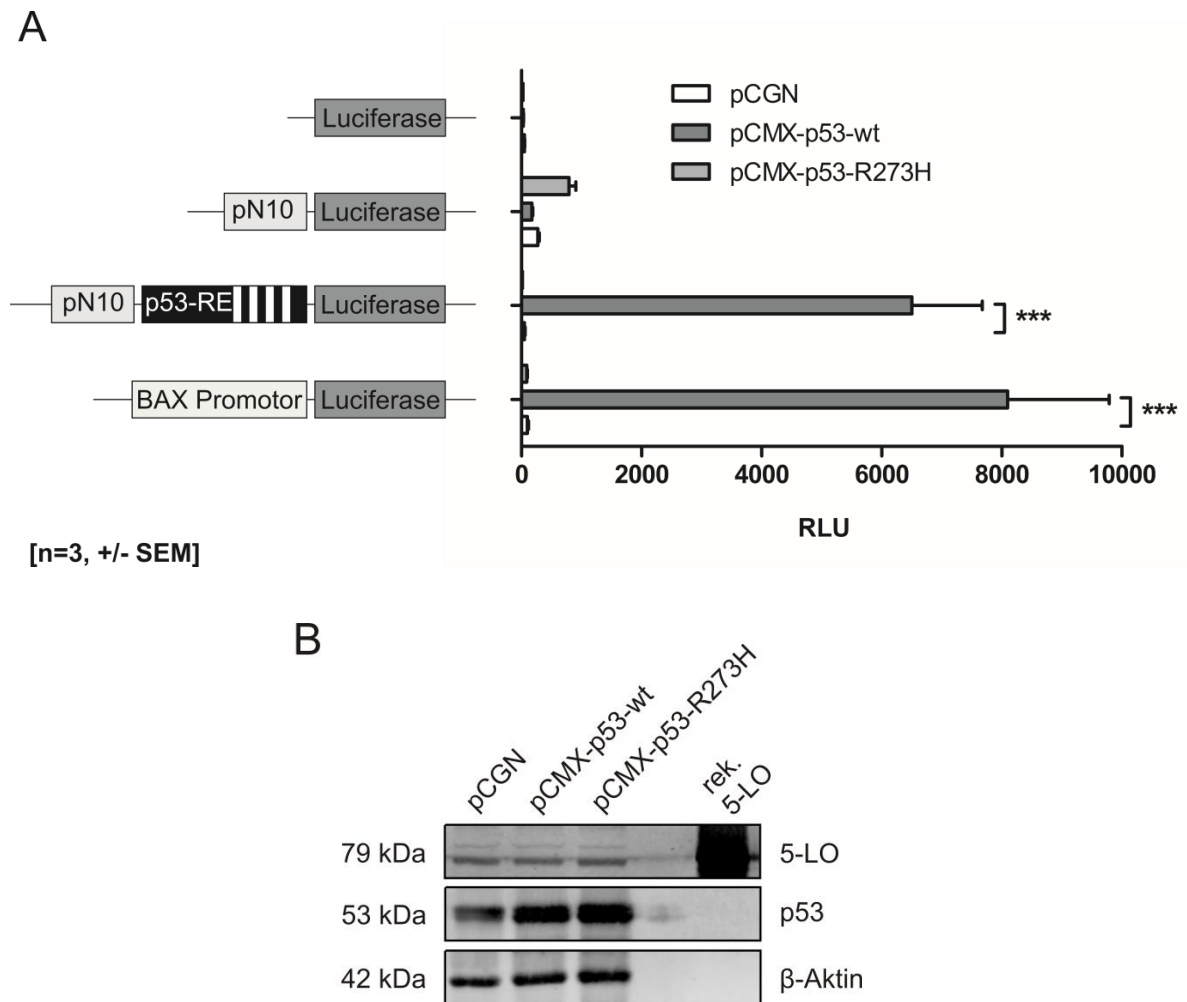


Abbildung 33. Induktion des 5-LO-Promotor-IntronG-Konstrukts durch die Überexpression von Wildtyp p53.

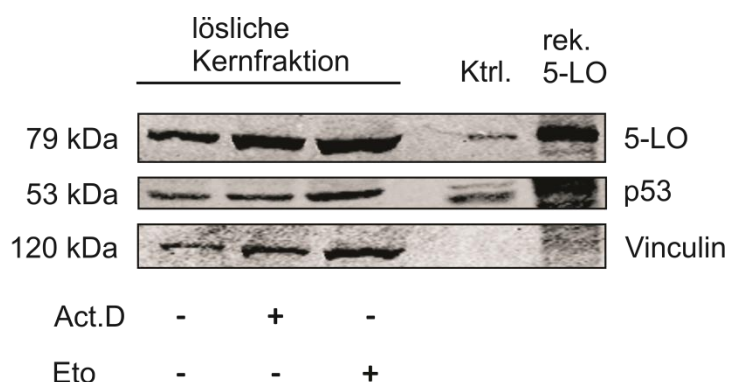
(A) Die Zelllinie HeLa wurde jeweils mit den Reportergenkonstrukten pN10, pN10-IntronG-p53 oder Bax-Luc, den Expressionsplasmiden pCGN, pCMX-p53-wt oder pCMX-p53-R273H, sowie der Renilla Kontrolle cotransfiziert. 40 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mittels Dual-Glo® Luciferase-Assay-System gemessen. Die Aktivität ist in RLU (Einheit: *relative light units*) angegeben und repräsentiert jeweils drei unabhängige Experimente, *** $p < 0,001$ bezogen auf den Kontrollvektor (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Die RLU-Werte wurden auf die interne pTKRenilla Kontrolle standardisiert. Diese Daten wurden in Kooperation mit Khalil Ahmad erhoben. (B) Expressionskontrolle der transfizierten HeLa-Zellen (5×10^6) nach 40 Stunden. Es wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000) und p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle diente β -Aktin und als Positivkontrolle rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

Abbildung 33 zeigt das Ergebnis des Luciferase-Assays nach transienter Kotransfektion der Konstrukte im Vergleich zu den Ausgangsvektoren pGL3-Basic und pCGN. Die Kotransfektion von pN10-IntronG-p53 und pCMX-p53wt führte zu einer deutlichen und signifikanten Transaktivierung des *ALOX5*-Promotors im Vergleich zum Ausgangsvektor, *** $p < 0,001$ (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Auch die Kotransfektion von Bax-Luc und pCMX-p53wt zeigte einen Anstieg der Luciferaseaktivität, *** $p < 0,001$ (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Wie erwartet zeigte der p53-Wildtyp-Vektor eine deutliche Aktivierung der Reportergenkonstrukte pN10-IntronG-p53 und Bax-Luc, wohingegen in kotransfizierten Zellen mit mutiertem p53 (Punktmutation in der DNA-Bindedomäne) keine Bax- und 5-LO-Promotoraktivität ermittelt werden konnte. Dieses Ergebnis liefert den Beweis einer kooperativen Transaktivierung des proximalen *ALOX5*-Promotors durch den Transkriptionsfaktor p53 als distalen Enhancer.

3.7 Biologische Relevanz der humanen 5-Lipoxygenase

3.7.1 Induktion und Lokalisation von p53 und 5-LO nach DNA-schädigenden Einflüssen

Um die Lokalisation der Proteine p53 und 5-LO genauer untersuchen zu können, wurden die Zellen 48 Stunden nach der jeweiligen Behandlung lysiert, fraktioniert und mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurde die Induktion und darauffolgende Lokalisation der Proteine im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Ganzzellextrakte und rekombinante 5-LO wurden als Kontrolle mitgeführt. Als Ladekontrolle dienten je nach Fraktion Vinculin (lösliche Kernfraktion), Lamin (membranäre Kernfraktion) und TBP (zytosolische Fraktion).



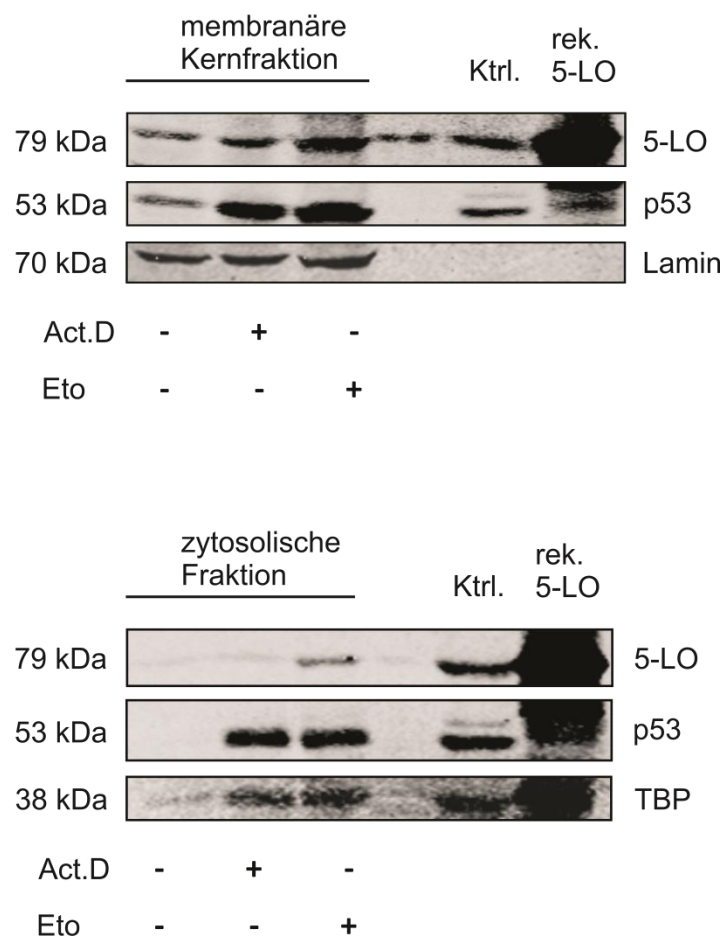


Abbildung 34. Lokalisationsassay von 5-LO und p53 in U2OS-Zellen.

Western Blot Analyse nach Trennung der Zellfraktionen. Die U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 48 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 40 μ l der aufgetrennten Fraktionen geblottet. Als Kontrolle wurden 100 μ g Zelllysate aus U2OS mitgeführt. Als Ladekontrolle dienten je nach Fraktion Vinculin, Lamin und TBP. Als Positivkontrolle dient rekombinante 5-LO aus *E.coli*. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern α -Maus-p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000), α -Maus-5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000), α -Maus-Vinculin (α -Maus-Vinculin, Abcam, 1:1000), α -Maus-Lamin (α -Maus-Lamin, Sigma, 1:1000) und α -Maus-TBP (α -Maus-TBP-SL30, Millipore, 1:500).

Die Ladekontrollen der jeweiligen Fraktionen wiesen einen deutlichen Unterschied der Proteinmengen auf, sodass eine Quantifizierung der Mengen von p53 und 5-LO in den verschiedenen Fraktionen nicht möglich war. Die erzielten Ergebnisse lassen lediglich eine Qualifizierung der p53 und 5-LO-Lokalisation zu. Wie erwartet, stieg die Gesamtmenge von p53 nach der Behandlung in den Zellen an, was auf eine erhöhte Autoinduktion zurückzuführen ist. Ebenso ist eine erhöhte Lokalisation von p53 in der zytosolischen als auch in der membranären Kernfraktion detektierbar. Des Weiteren ließ sich ein Anstieg der 5-LO in der löslichen sowie in der membranären Kernfraktion nachweisen. Da der

Lokalisationsassay keine signifikanten und quantifizierbaren Ergebnisse lieferte, wurde die Induktion und darauffolgende Lokalisation der Proteine mittels Immunfluoreszenz ermittelt.

3.7.2 Kolokalisation von 5-LO mit p53 im Nukleus

In unstimulierten Zellen befindet sich die 5-LO, je nach Zelltyp, im Nukleus oder im Zytosol. Nach Stimulationen, z.B durch Zellstress, transloziert die 5-LO aus dem Zytosol an die Zellkernmembran [253]. Die Lokalisation des Tumorsuppressors p53 weist in unstimulierten Zellen eine diffus nukleäre Verteilung auf [254][255].

Um die subzelluläre Lokalisation der humanen 5-LO und p53 nach Behandlung mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto genauer charakterisieren zu können, wurden U2OS-Zellen untersucht, welche die 5-LO und p-53 endogen exprimieren. Dafür wurden indirekte Immunofluoreszenz-Experimente durchgeführt, welche es ermöglichten die räumliche Anordnung der Proteine zu analysieren. Nach der Behandlung der Zellen mit 5 nM Act.D und 10 μ M Eto wurden die Proteine durch Mehrfachfärbung mit einem anti-5-LO- und einem anti-p53-Antikörper im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Leica TCS SP5, Frankfurt Center for Advanced Light Microscopy [FCAM]) detektiert. Als Kontrolle dienten die unbehandelten Zellen. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Jessica Roos durchgeführt.

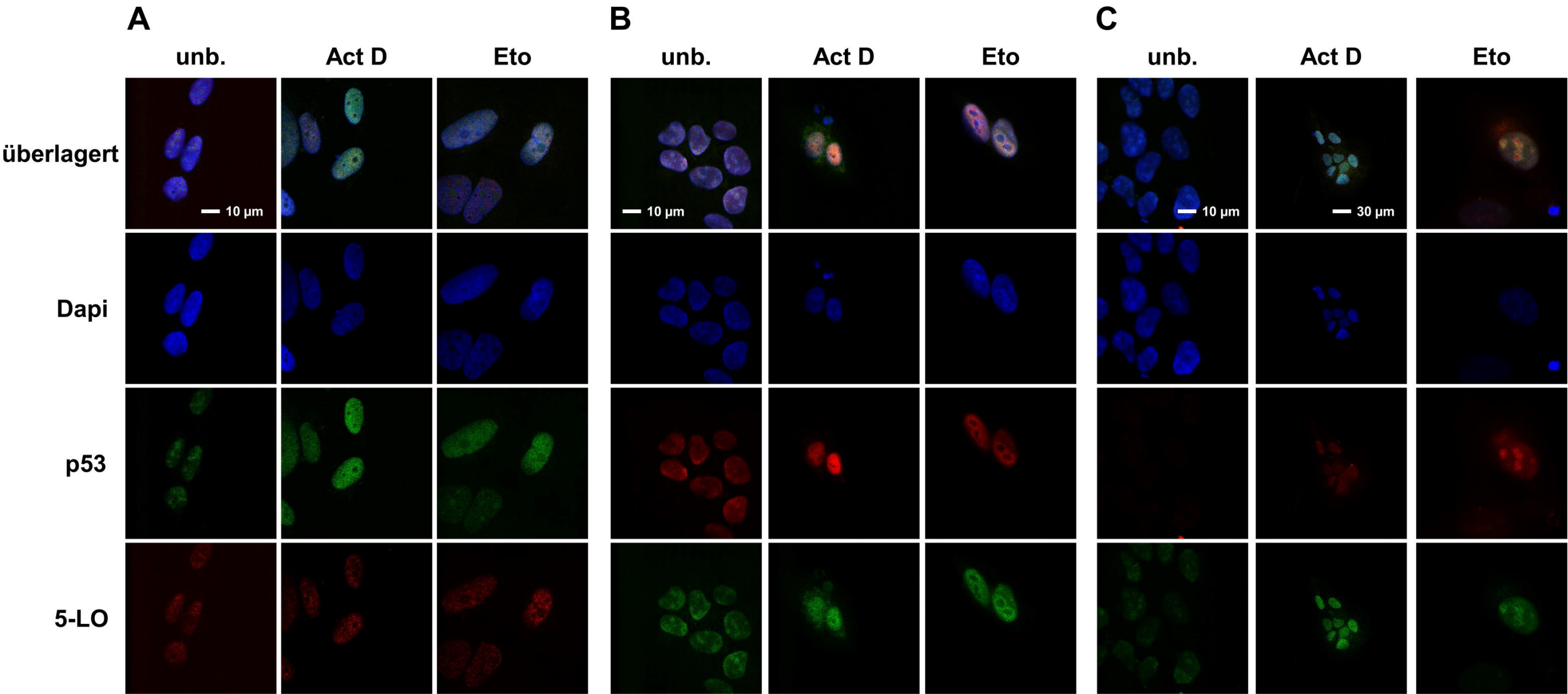


Abbildung 35. Kolokalisation von 5-LO und p53 im Nukleus humaner U2OS-Zellen.

Lokalisation von p53 und 5-LO in U2OS-Zellen. Die U2OS-Zellen wurden für 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt, anschließend mit 4% Formaldehyd-Lsg. fixiert, permeabilisiert und mit den jeweiligen Antikörpern angefärbt. **(A)** Markierung von p53 mit einem α -Maus-p53 (DO-1) Antikörper und Detektion mittels Alexa-488-gekoppelten (α -Maus-IgG) Sekundärantikörpers (grün). Die Markierung der 5-LO erfolgte mit einem α -Maus-5-LO (1551-Schweden) und einem Alexa-594-gekoppelten (α -Kaninchen IgG) Sekundärantikörper (rot). **(B)** Markierung von p53 mit einem α -Kaninchen-p53 (NCL-p53-CM1) Antikörper und Detektion durch einen Alexa-594-gekoppelten (α -Kaninchen-IgG-Antikörper) Sekundärantikörper (rot). Die Markierung der 5-LO erfolgte mit einem α -Maus-5-LO-Antikörper (BD) und einem Alexa-488-gekoppelten (α -Maus-IgG) Sekundärantikörper (grün). **(C)** Markierung von p53 mit einem α -Kaninchen-p53 (Acety-p53 [Lys320]) Antikörper und Detektion mit einem Alexa-594-gekoppelten (α -Kaninchen-IgG) Sekundärantikörper (rot). Die Detektion der 5-LO erfolgte mit einem α -Maus-5-LO-Antikörper (BD) und einem Alexa-488-gekoppelten (α -Maus-IgG) Sekundärantikörper (grün). Die chromosomale DNA wurde mittels DAPI angefärbt (blau). Die Kolokalisation von p53 und der 5-LO wird durch die gelbe Färbung der Präparate angezeigt, welche durch die Überlagerung der Farben rot und grün entsteht. Die Messung wurde an einen Konfokalen Laser Mikroskop von Leica TCS SP5 (Frankfurt Center for Advanced Light Microscopy [FCAM]) durchgeführt und mittels Fiji Software (www.fiji.sc) nachbearbeitet.

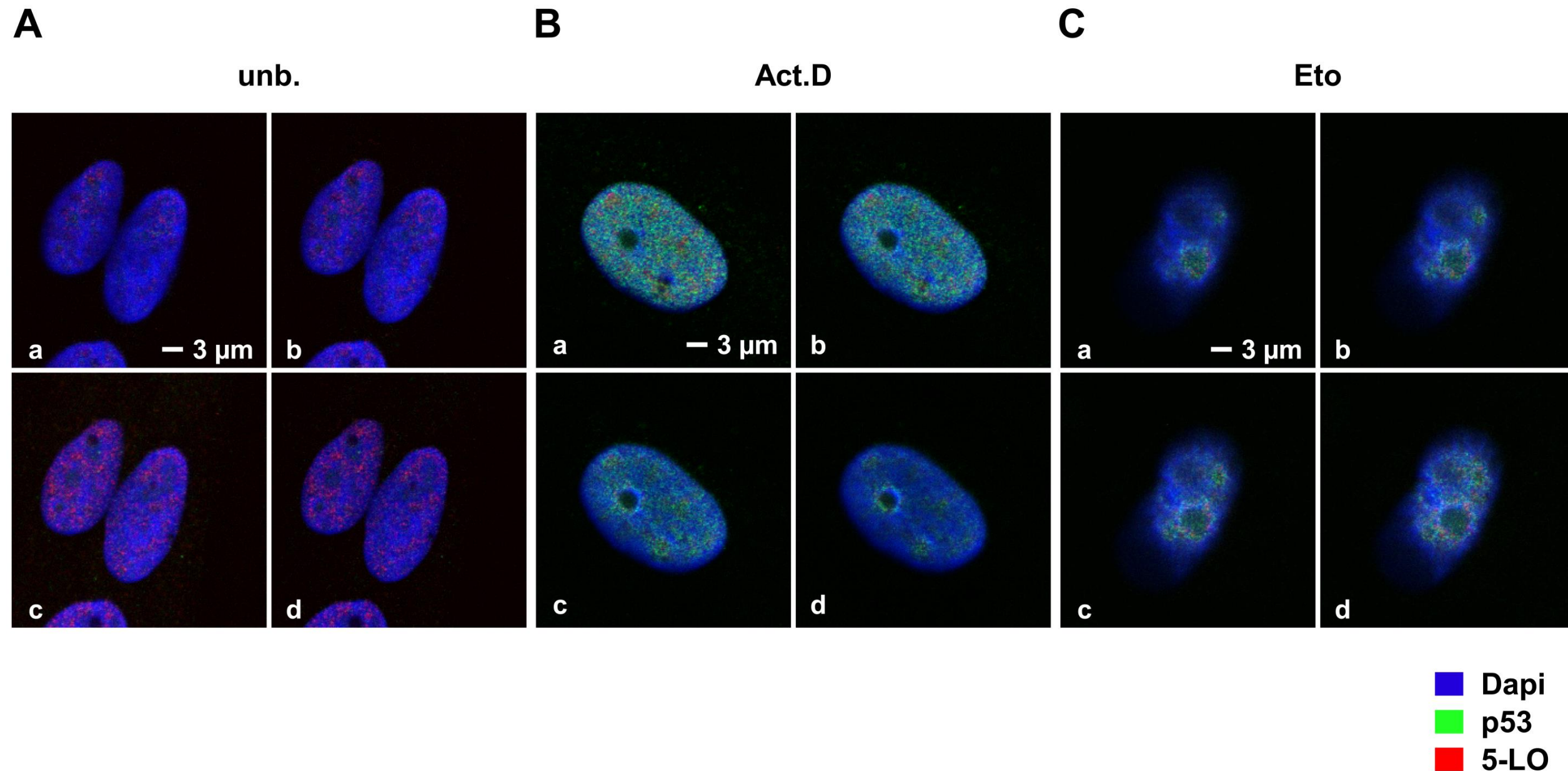


Abbildung 36. Aufnahme von optischen Serienschritten.

Dargestellt ist die Aufnahme von optischen Serienschritten (Z-Stapel) a-d bei einer Tiefenschärfe von ca. 0.25 μm . U2OS-Zellen wurden für 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μM Eto behandelt. Anschließend wurden die Zellen mittels 4% Formaldehyd-Lsg. fixiert, permeabilisiert und mit einem α -Maus-p53-Antikörper (DO-1) markiert. Die Detektion erfolgte anschließend mit einem Alexa-488-gekoppelten (α -Maus-IgG) Sekundärantikörper (grün). Die Markierung der 5-LO erfolgte mit einem α -Maus-5-LO-Antikörper (1551-Schweden) und die Detektion mit einem Alexa-594-gekoppelten (α -Kaninchen-IgG) Sekundärantikörper (rot). Die chromosomale DNA wurde mittels DAPI angefärbt (blau). Die Aufnahmen zeigen (**A**) unbehandelte Zellen, (**B**) Act.D behandelte Zellen und (**C**) Eto behandelte Zellen. Bereiche, in denen 5-LO und p53 kolokalisieren, zeigten durch die Überlagerung eine gelbliche Färbung. Die Messung wurde an einem Konfokalen Laser Mikroskop von Leica TCS SP5 (Frankfurt Center for Advanced Light Microscopy [FCAM]) durchgeführt und mittels Fiji Software (www.fiji.sc) nachbearbeitet.

In den unbehandelten U2OS-Zellen konnte bei allen Untersuchungen eine charakteristische diffus nukleäre Lokalisation von p53 (in Abbildung 35; A: grünes Fluorochrome; B und C: rotes Fluorochrom) beobachtet werden (Abbildung 35 und 36). Eine ähnliche Lokalisation zeigte sich auch für die 5-LO (Abbildung 35; A: rotes Fluorochrom; B und C: grünes Fluorochrom), welche in einer partiellen Kolokalisation beider Proteine resultierte (Abbildung 35). In allen Experimenten konnte nur eine sehr geringe Färbung der Proteine im Zytosol detektiert werden. Nach der Stimulation der U2OS-Zellen mit Act.D oder Eto kam es zu einer erhöhten Akkumulierung des Transkriptionsfaktors p53 sowie der 5-LO im Nukleus.

Zudem konnte in den behandelten U2OS-Zellen (Abbildung 35A, B und C) eine eindeutige Kolokalisation von p53 und 5-LO (gelb) in perinukleären Dots detektiert werden. Besonders auffällig war hierbei die Kolokalisation der Proteine p53 und 5-LO um rundlich, verdunkelte Bereiche im Nukleus. Dabei könnte es sich möglicherweise um Kernkörperchen (Nukleoli) handeln. Die Nukleoli sind durch ihre runde und dunkle Morphologie in den Zellkernen gut zu erkennen [256][257].

Durch eine dreifach vergrößerte Serienschmitt-Aufnahme (Abbildung 36) wurde die Kolokalisation der beiden Proteine in Form von perinukleären Dots um die verdunkelten Bereiche sowie im Nukleus noch einmal sichtbar (Z-Stapel a-d, Tiefenschärfe von 0,25 Mikron). Die Lokalisation bzw. Kolokalisation der Proteine p53 und 5-LO konnte durch die Anwendung der verschiedenen Mehrfachfärbungen unter Verwendung unterschiedlicher 5-LO- und p53- Antikörper zusätzlich bestätigt werden. In weiterführenden Experimenten wurde daher der Einfluss von 5-LO auf die transkriptionelle Funktion von p53 untersucht.

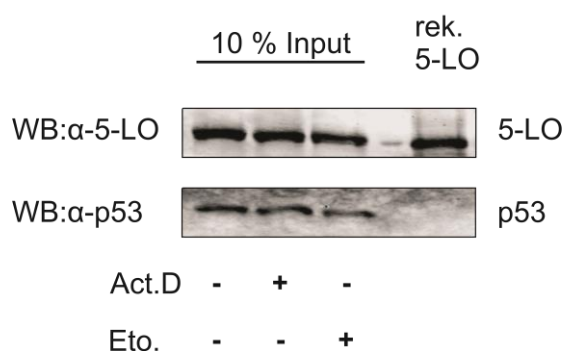
3.7.3 Identifizierung der humanen 5-LO als Interaktionspartner von wtp53

Nachdem die vorausgegangenen Immunfluoreszenz-Analysen darauf hinwiesen, dass 5-LO und p53 kolokalisieren, wurden Protein-Interaktionsversuche zwischen den beiden Proteinen durchgeführt. Eine mögliche Interaktion wurde mittels Co-Immunopräzipitation untersucht. Hierbei wurde zum einen die Protein-Interaktion von überexprimierter, und zum anderen von rekombinanter 5-LO ermittelt. Zur Präzipitation der p53- bzw. 5-LO-bindenden Proteine wurde ein α -p53 (DO-1) oder ein α -5-LO (BD) Antikörper verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot Analyse. Die

Inkubation der Beads mit den Gesamtzellextrakten (ohne Antikörper) diente zur Kontrolle, um mögliche unspezifische Bindungen ausschließen zu können.

3.7.4 Co-IP von transfizierten und behandelten Ganzzellextrakten von U2OS-Zellen

A



B

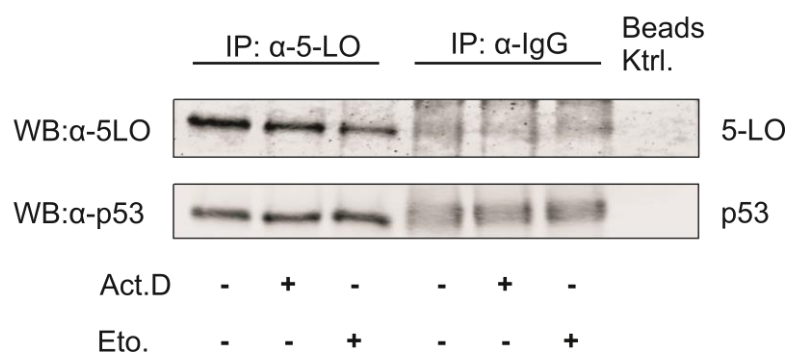


Abbildung 37. Co-Immunopräzipitation von p53 und 5-LO.

Western Blot Analyse immunopräzipitierter Proteinkomplexe. U2OS-Zellen wurden mit pcDNA3.1-5LO transfiziert, nach 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto inkubiert und nach 48 Stunden extrahiert. **(A)** Zur Kontrolle wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen (10 % Input). **(B)** Co-IP von überexprimierter 5-LO und p53. Es wurden jeweils 500 µg Gesamtprotein behandelte sowie unbehandelte Ganzzellextrakte über Nacht präzipitiert. Die IP erfolgte mittels α-5-LO Antikörper (α-Maus-5-LO, BD, 2 µg) oder einem α-Maus-IgG-Antikörper als Kontrolle. Nach der Präzipitation wurden die Proteine von den Beads eluiert und mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurden die Antikörper α-p53 (α-Maus-p53, DO-1, 1:1000) und α-5-LO (α-Maus-5LO, 6A12, 1:200) verwendet. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E.coli*. Beads Ktrl.: Inkubation der Beads ohne Antikörper.

3.7.5 Co-IP mit rekombinanter 5-LO und behandelter Ganzzelextrakte von HEK293T-Zellen

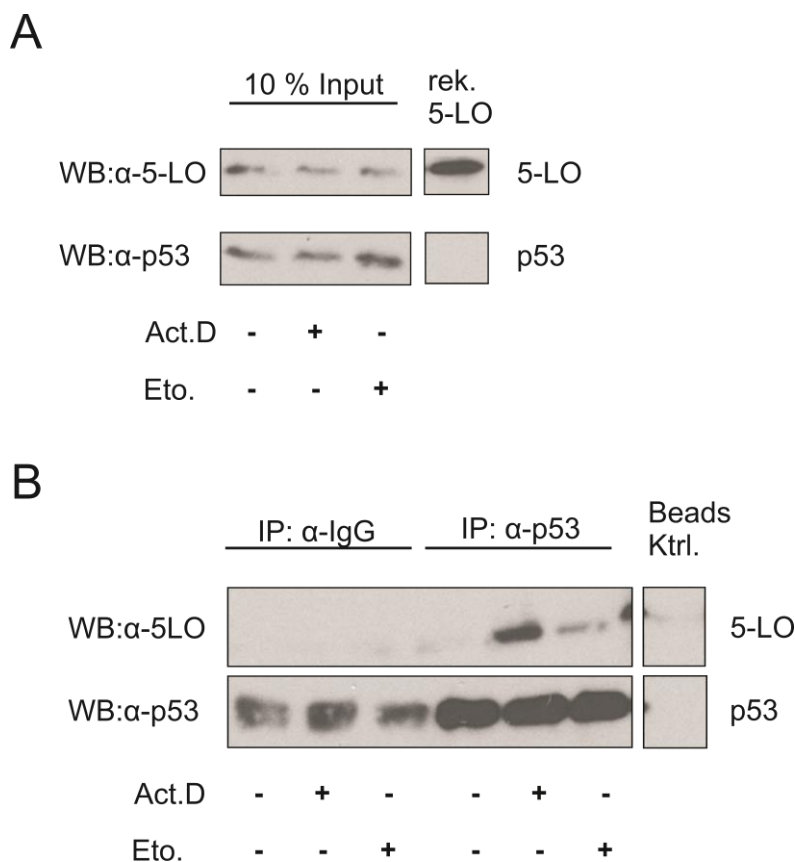


Abbildung 38. Co-Immunopräzipitation von p53 und rekombinanter 5-LO.

Western Blot Analyse immunopräzipitierter Proteinkomplexe. HEK293T-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto inkubiert und nach 48 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 500 µg Gesamtprotein behandelte sowie unbehandelte Ganzzelextrakte über Nacht präzipitiert. Die IP erfolgte mittels α-p53 Antikörper (α-Maus-p53, DO-1, 2 µg) sowie einem α-Maus-IgG-Antikörpers als Kontrolle. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 2 h mit rekombinanter 5-LO (100 µg in 1 ml Ripa-Puffer). Nach der Präzipitation wurden die Proteine von den Beads eluiert und mittels Western Blot analysiert. **(A)** Zur Kontrolle wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen (10 % Input). **(B)** Co-IP von rekombinanter 5-LO und p53. Zur Detektion wurden die Antikörper α-p53 (α-Kaninchen-p53, CM-1, 1:1000) und α-5-LO (α-Maus-5-LO, BD, 1:1000) verwendet. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E.coli*. Beads Ktrl: Inkubation der Beads mit Gesamtprotein und anschließend mit rekombinater 5-LO, jedoch ohne Antikörper.

Die Proteine 5-LO und p53 konnten jeweils in allen Eluatfraktionen nachgewiesen werden (unb; Act.D; Eto). Diese entsprechen den jeweilig erwarteten Größen von 53 kDa (p53) und 79 kDa (5-LO). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass keine spezifischen Proteinkomplexe unter Verwendung des gekoppelten α -Maus-IgG-Antikörpers detektiert wurden. Magnetische Beads, die jeweils nur mit den jeweiligen Protein bzw. Zellextrakten inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine spezifischen Banden im Blot. Durch die Co-IP mit Hilfe magnetischer Beads konnte damit die Interaktion zwischen überexprimierter und rekombinanter 5-LO und p53 nachgewiesen werden.

3.7.6 Expressionsanalysen p53-regulierter Targetgene nach 5-LO-Überexpression

Der Zusammenhang von 5-LO-Überexpression und einer gesteigerten Proliferationsrate von Tumorgewebe wird in der Literatur zunehmend diskutiert [152,258,259]. Aufgrund dessen wurden Expressionsstudien zu p53-regulierten Targetgenen in 5-LO überexprimierenden U2OS- und HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die U2OS- und HeLa-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen nach der Transfektion jeweils mit 5 nM Act.D oder mit 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderungen der Transkriptmenge von *ALOX5* sowie der p53-regulierten Targetgene wurde mittels RT-qPCR charakterisiert.

Die für *ALOX5* verwendeten Primer binden Exon übergreifend (5/6-Exon) und erfassen sowohl die endogenen als auch die überexprimierten *ALOX5*-Transkripte.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Transfektionseffizienz. Transfizierte U2OS-Zellen, mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-5LO, wiesen einen deutlichen Anstieg der *ALOX5*-Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA3.1) auf. Dabei stieg die Anzahl an *ALOX5*-Transkripten deutlich nach den jeweiligen Behandlungen mit Act.D ($\Delta 70\%$) und mit Eto ($\Delta 60\%$).

Da U2OS-Zellen bereits sehr hohe, basale Level von 5-LO exprimieren, konnte nach Überexpression des Proteins (5-LO) kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

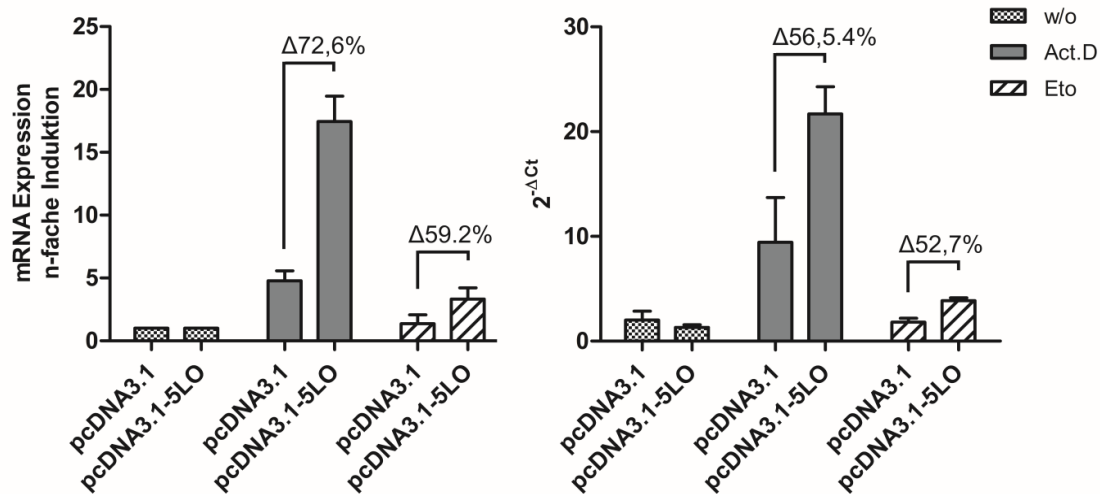
ALOX5-Expression

Abbildung 39. RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5* in transfizierten U2OS-Zellen.

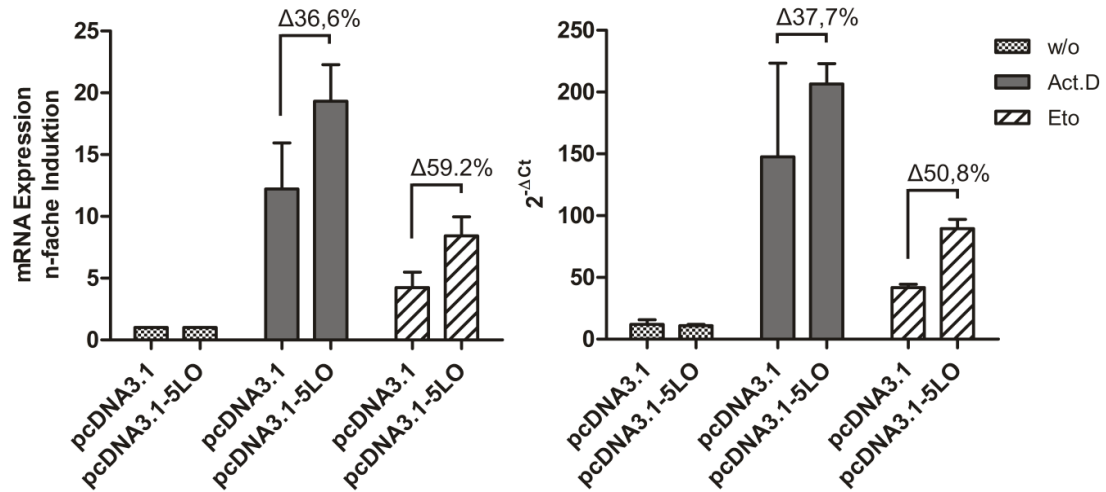
U2OS-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderung der Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression von *ALOX5* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta Ct}$ -Wert dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Nachfolgend wurden Targetgene untersucht, von denen bekannt ist, dass sie durch wtp53 reguliert werden. Hierbei sollte der direkte Einfluss der überexprimierten 5-LO auf die p53-abhängige transkriptionelle Regulation der Gene überprüft werden. Dazu wurde die Änderung der Transkription der Targetgene nach der Transfektion mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO untersucht. Hierbei wurden diverse p53-Targetgene, die unter anderem eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation oder der Apoptose spielen, analysiert.

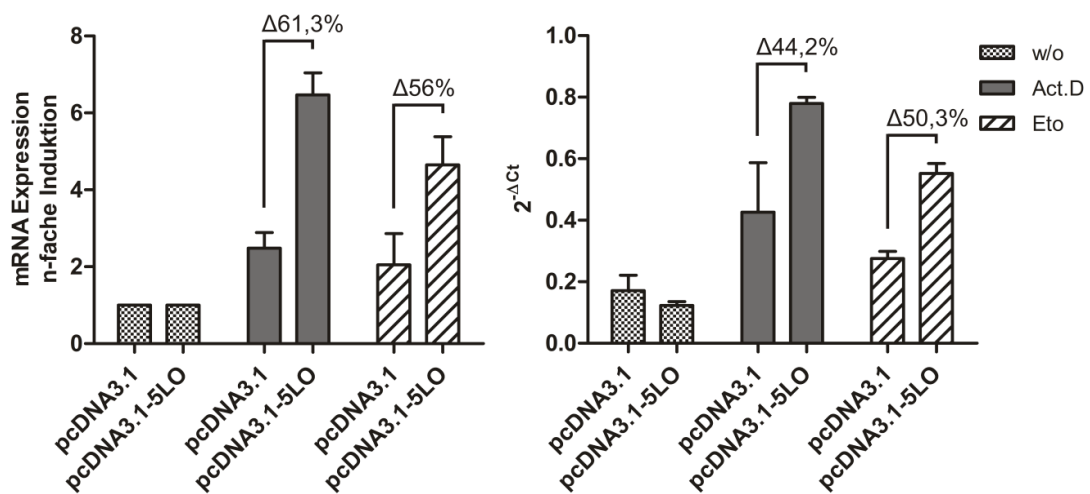
Wie aus den RT-qPCR-Analysen der Expression hervorgeht, konnte nur in wenigen Fällen eine Expressionsveränderung p53-regulierter Targetgene beobachtet werden. Insbesondere die Targetgene *CDKN1A* (*Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitor 1A* (p21)), *DDB2* (*Damaged-DNA-binding-Protein 2*), *PCNA* (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) und *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) zeigten eine erhöhte Expressionsänderung in 5-LO-überexprimierten Zellen. Nach den Behandlungen stieg die Transkriptmenge von *CDKN1A* um $\Delta 36,6\%$ (Act.D) und um $\Delta 59,2\%$ (Eto). Ein ähnliches Ergebnis konnte für das Gen *DDB2* gezeigt werden, bei dem die Expression um $\Delta 37,7\%$ (Act.D) und $\Delta 50,8\%$ (Eto) zunahm.

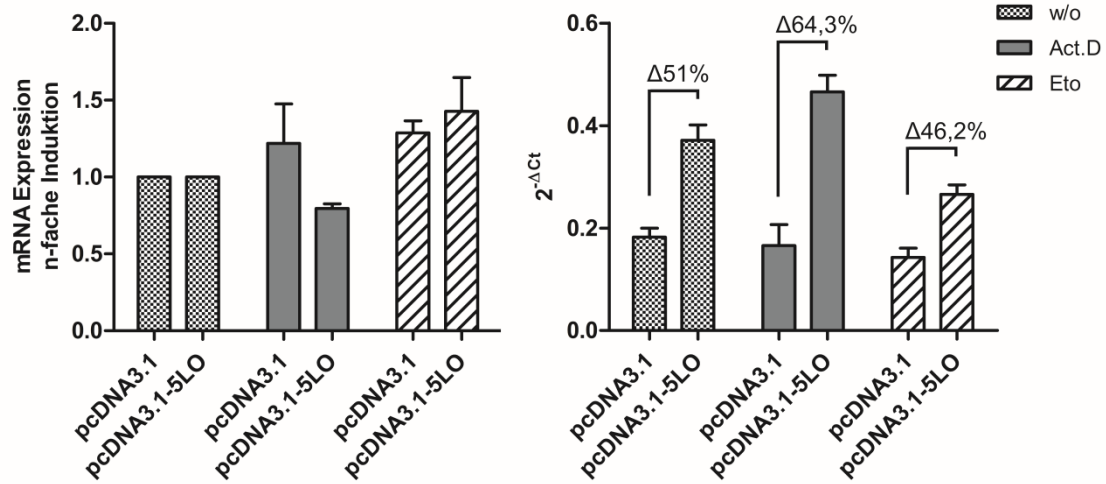
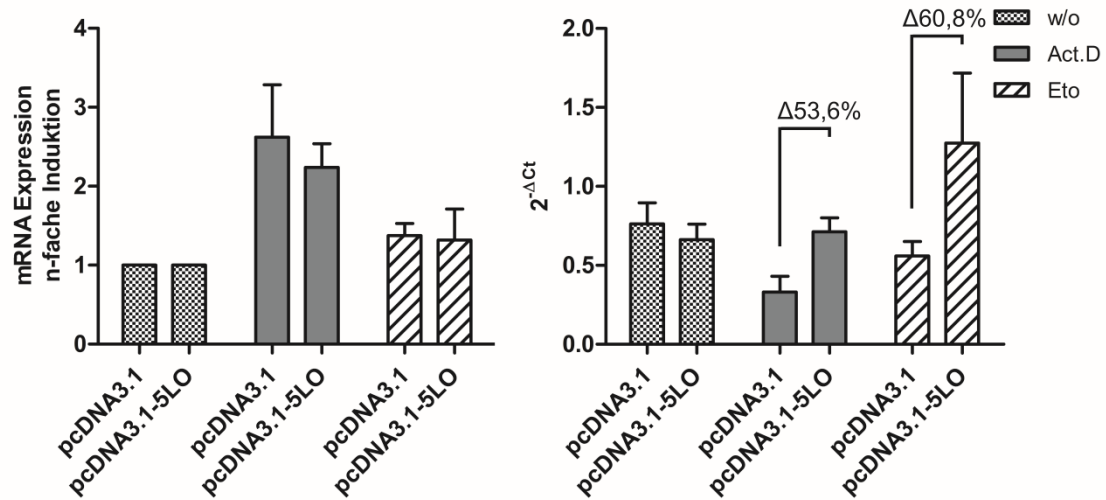
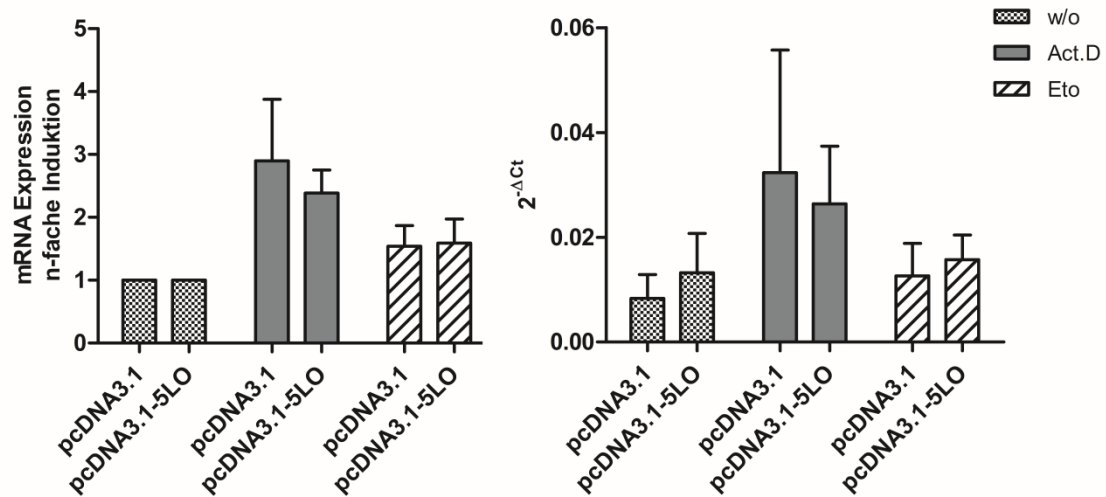
Auch die Transkriptmenge von *PCNA* stieg deutlich in den 5-LO-überexprimierten Zellen an. Dabei nahm die basale Expression um 51% (w/o), 64,3% (Act.D) und 46,2% (Eto) zu.

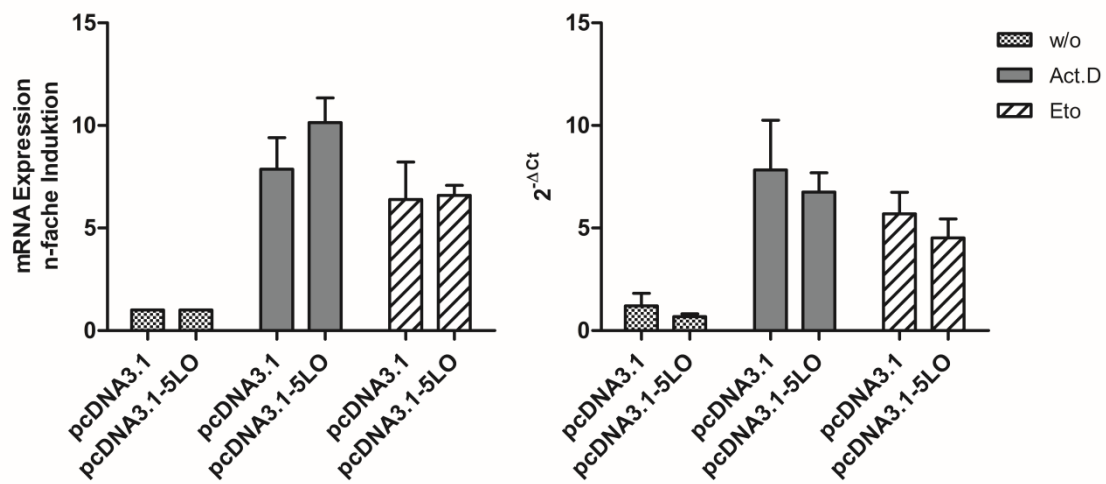
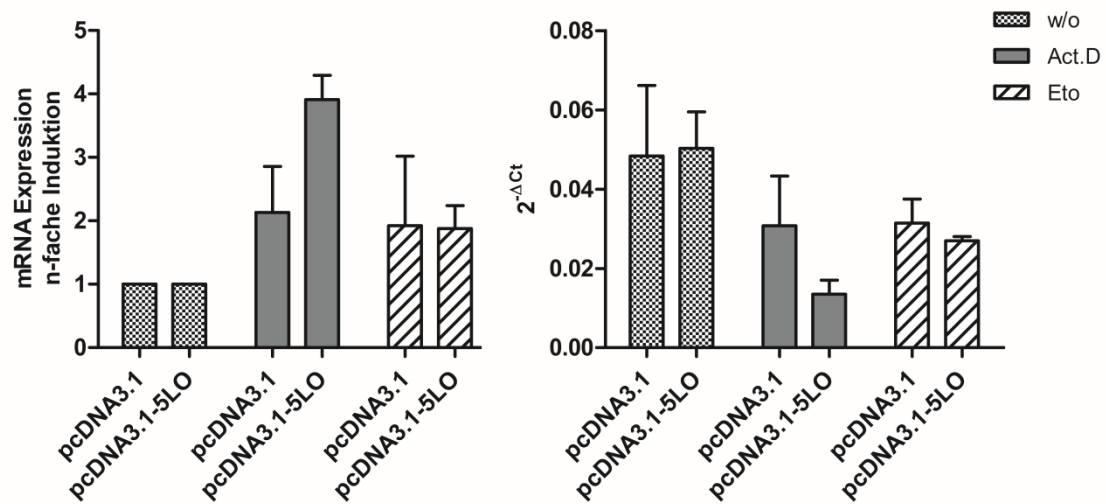
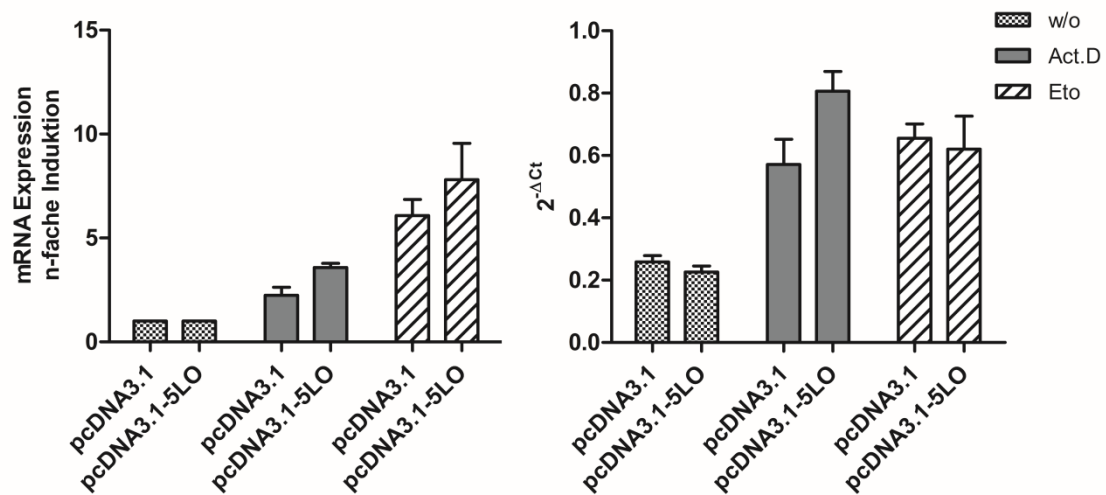
CDKN1A-Expression



DDB2-Expression



PCNA-Expression**PTEN-Expression****BTG2-Expression**

GADD45 α -Expression**14-3-3 σ -Expression****EGFR-Expression**

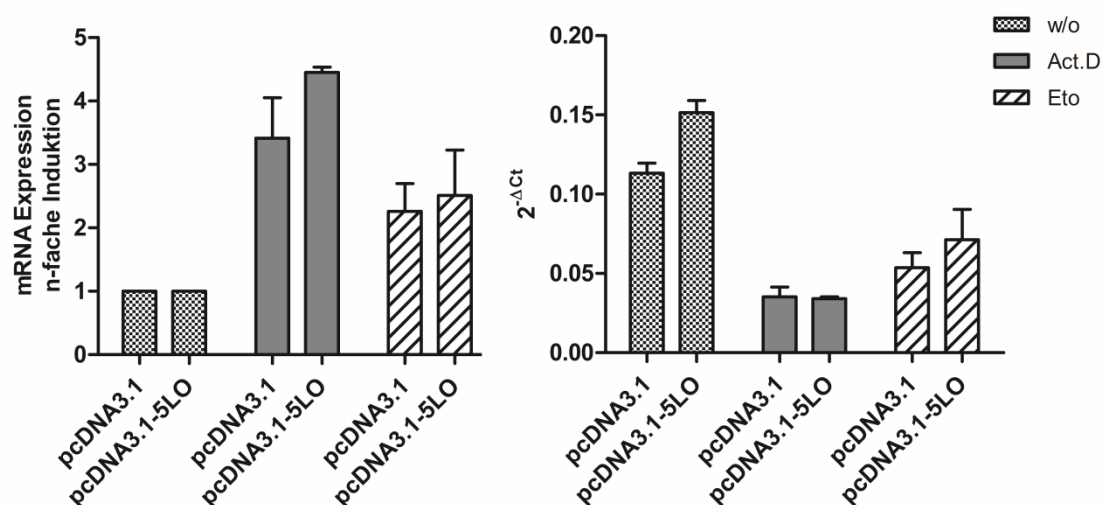
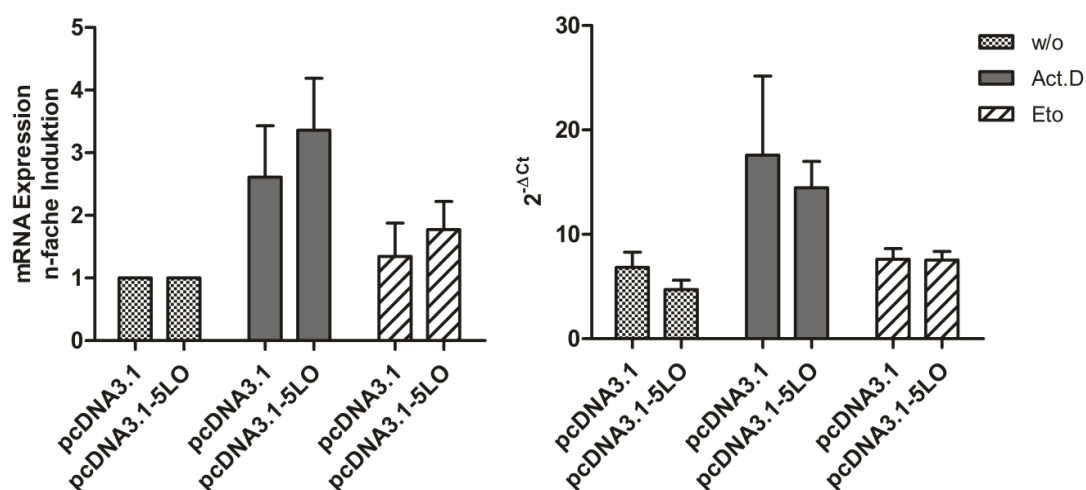
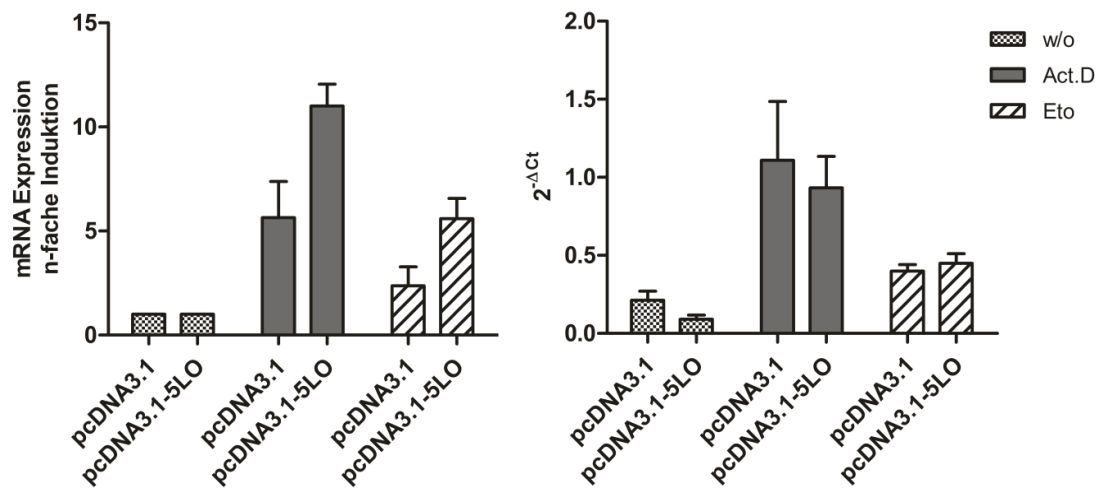
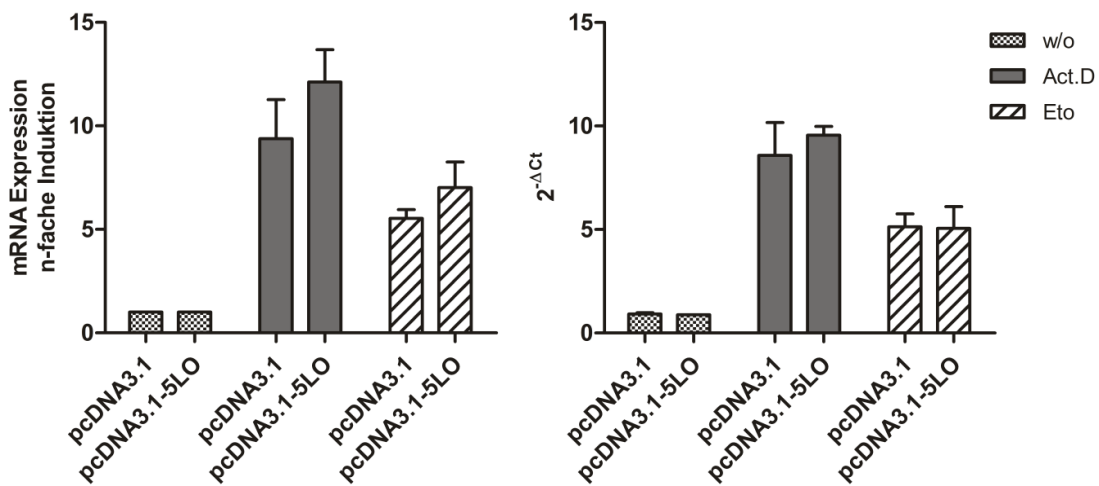
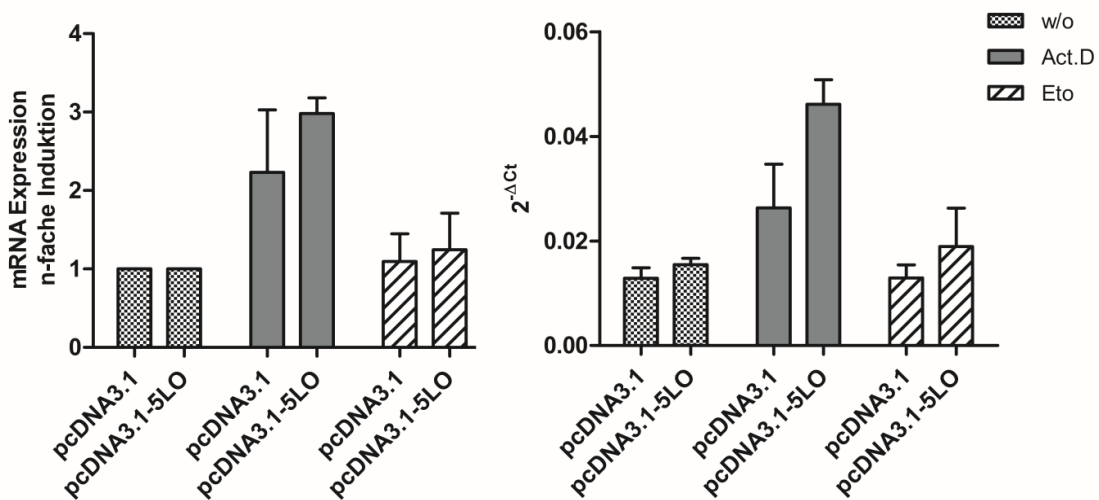
CyclinD1-Expression

Abbildung 40. RT-qPCR-Analyse der Expression von Genen die an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind in transfizierten U2OS-Zellen.

U2OS-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderung der Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression von *CDKN1A*, *DDB2*, *PCNA*, *PTEN*, *BTG2*, *GADD45 α* , *14-3-3 σ* , *EGFR* und *CyclinD1* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta Ct}$ -Wert dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

BAX-Expression

PUMA-Expression**PAG-Expression****NOXA-Expression**

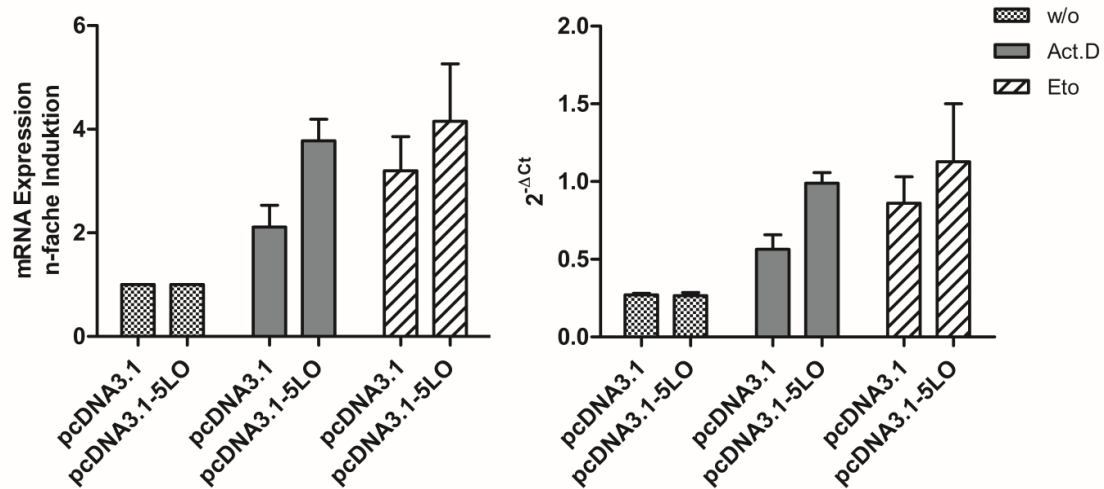
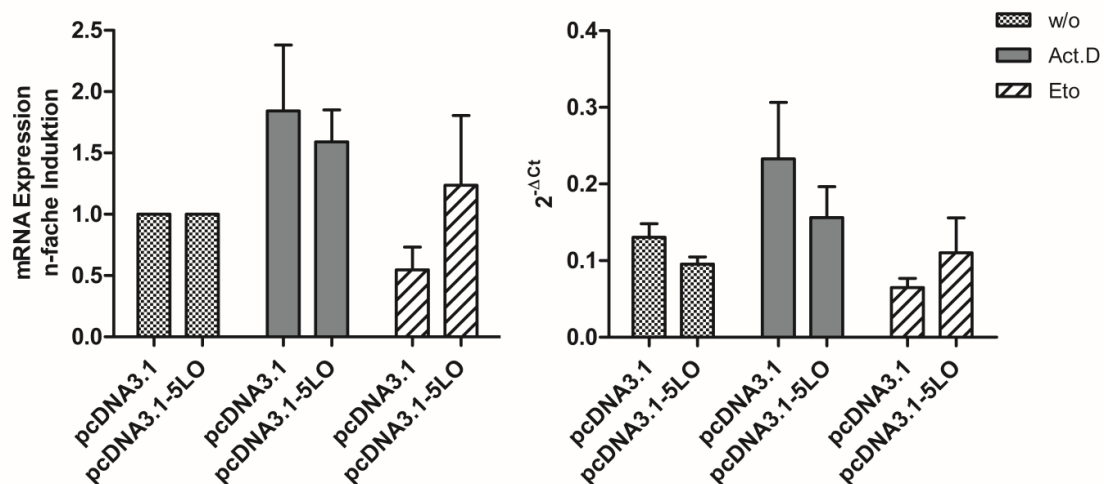
DR5/KILLER-Expression**P2XM-Expression**

Abbildung 41. RT-qPCR-Analyse der Expression apoptotischer Targetgene in transfizierten U2OS-Zellen.

U2OS-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderung der Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression von *BAX*, *PUMA*, *PAG*, *NOXA*, *DR5/KILLER* und *P2XM* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta Ct}$ -Wert dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Im Vergleich zu den Targetgenen *CDKN1A* und *DDB2* konnte für die pro-apoptotischen Gene wie z.B. *BAX*, *PUMA* und *PAG* keine signifikante Änderung auf basaler Expressionsebene beobachtet werden. Die Targetgene *NOXA* und *DR5/KILLER* zeigten eine leichte Veränderung der basalen Transkriptmenge.

Ebenso wie in den U2OS-Zellen wurde zunächst die Effizienz der Transfektion überprüft. Dabei wiesen transfizierte HeLa-Zellen, mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-5LO, einen deutlichen Anstieg der Transkriptmenge von *ALOX5* im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA3.1) auf. Dabei stieg die Anzahl der Transkripte deutlich nach den jeweiligen Behandlungen mit Act.D ($\Delta 42,8\%$) und mit Eto ($\Delta 58,3\%$) an.

ALOX5-Expression

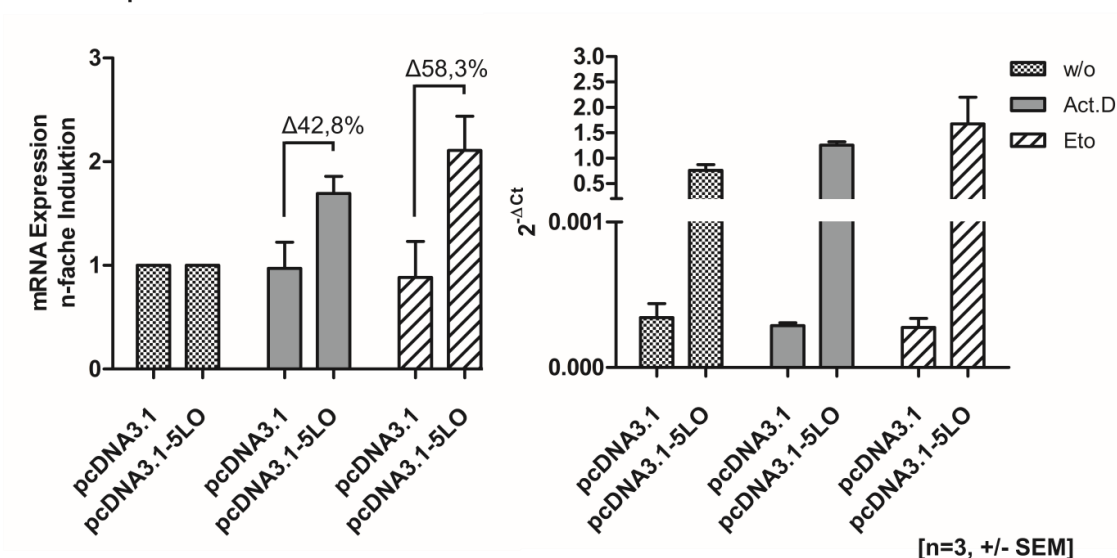
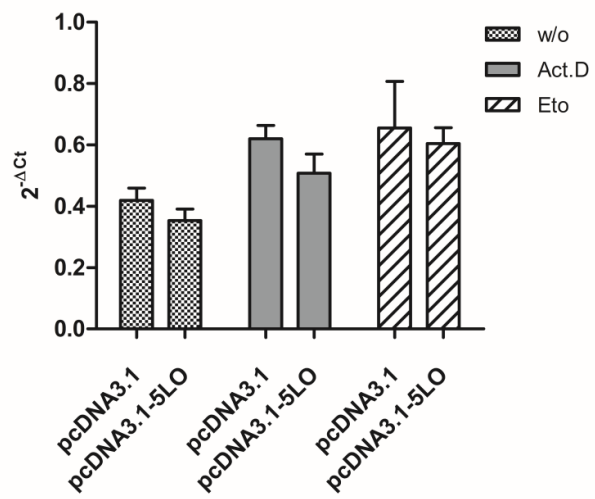
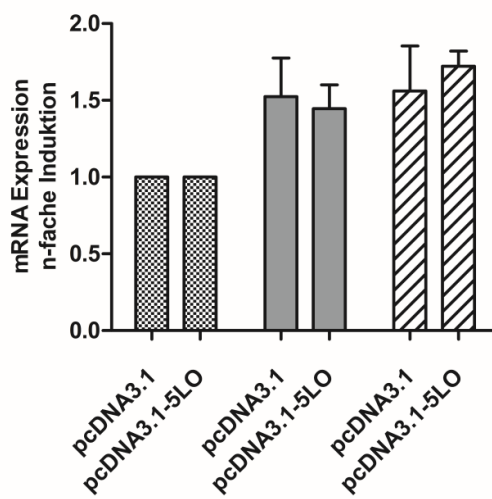
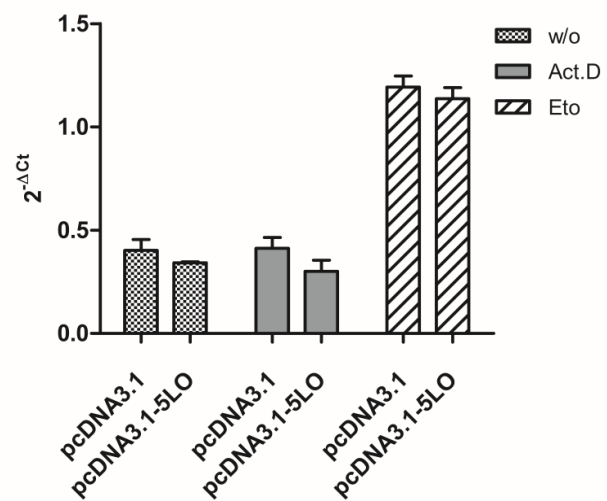
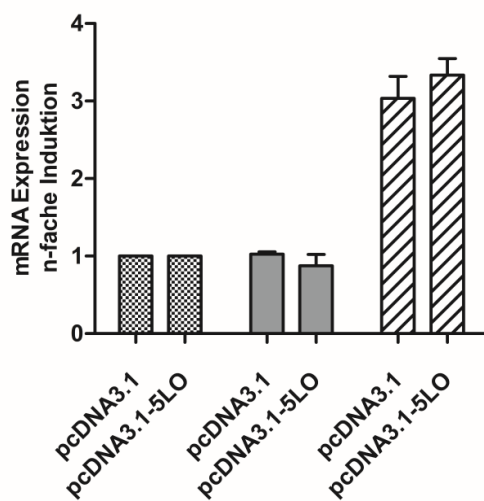
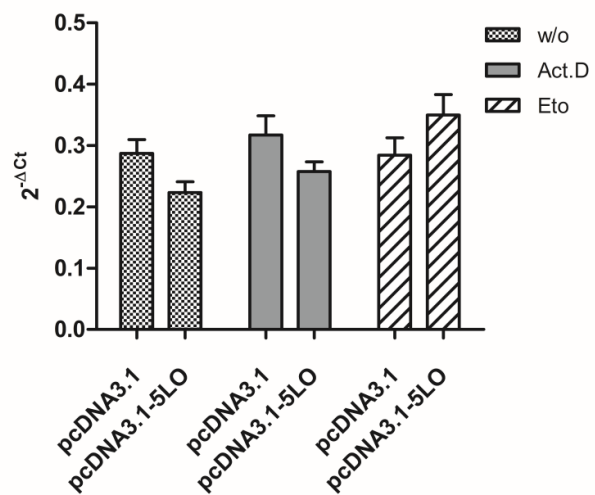
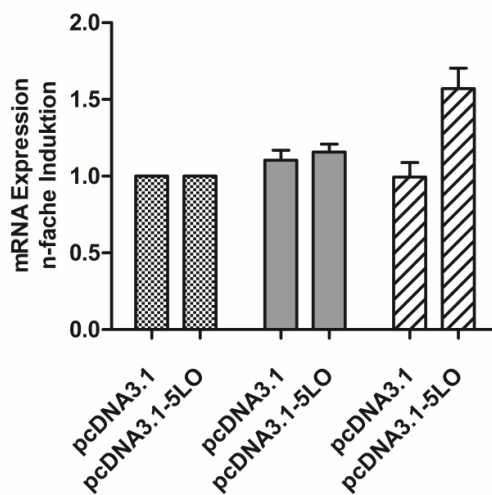
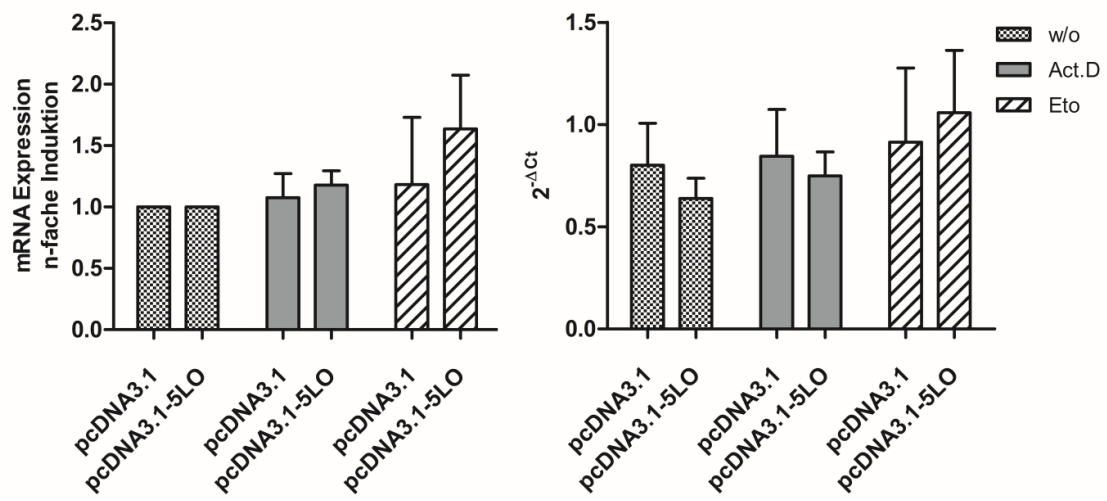
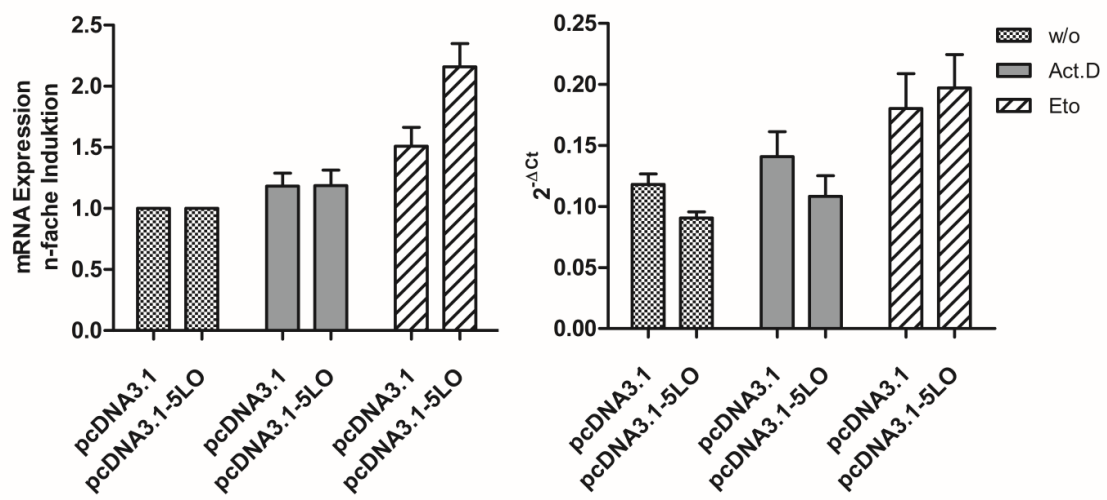


Abbildung 42. RT-qPCR-Analyse der Expression von *ALOX5* in transfizierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderung der Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. Die Expression von *ALOX5* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta Ct}$ -Wert dargestellt.

Im Gegensatz zu den U2OS-Zellen exprimieren HeLa-Zellen nur eine geringe, basale Menge an endogener 5-LO. Demzufolge konnte selbst in unbehandelten Zellen ein deutlicher Anstieg der *ALOX5*-Transkripte nach der 5-LO-Überexpression beobachtet werden. Dieser $2^{-\Delta Ct}$ -Wert korreliert wiederum mit dem Wert aus den U2OS-Zellen ($2^{-\Delta Ct}$ -Wert ~ 1.0).

TP53-Expression**CDKN1A-Expression****BAX-Expression**

PUMA-Expression**GADD45 α -Expression**

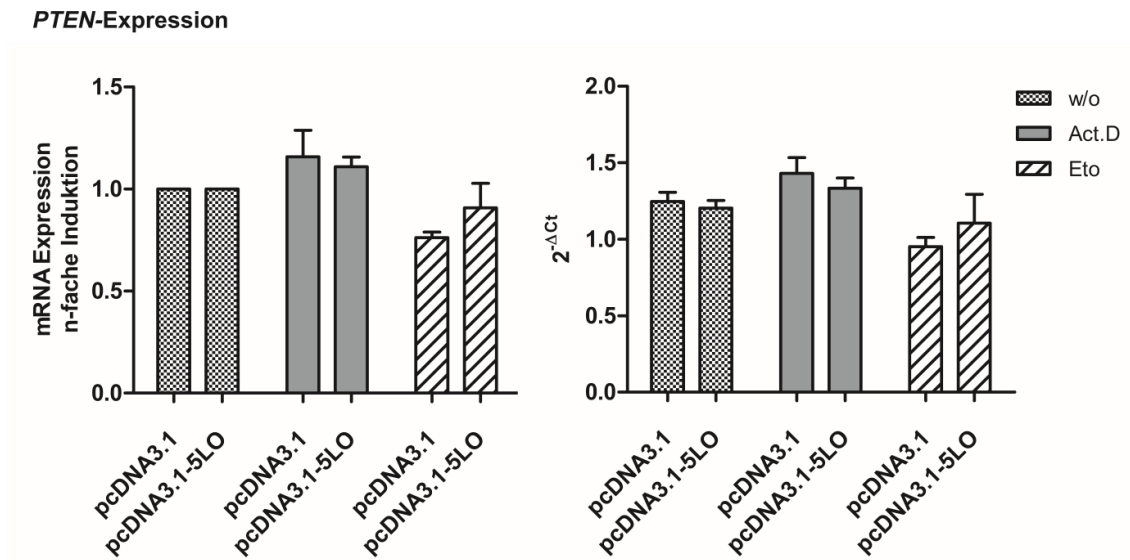


Abbildung 43. RT-qPCR-Analyse der Expression p53-regulierter Targetgene in transfizierten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderung der Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

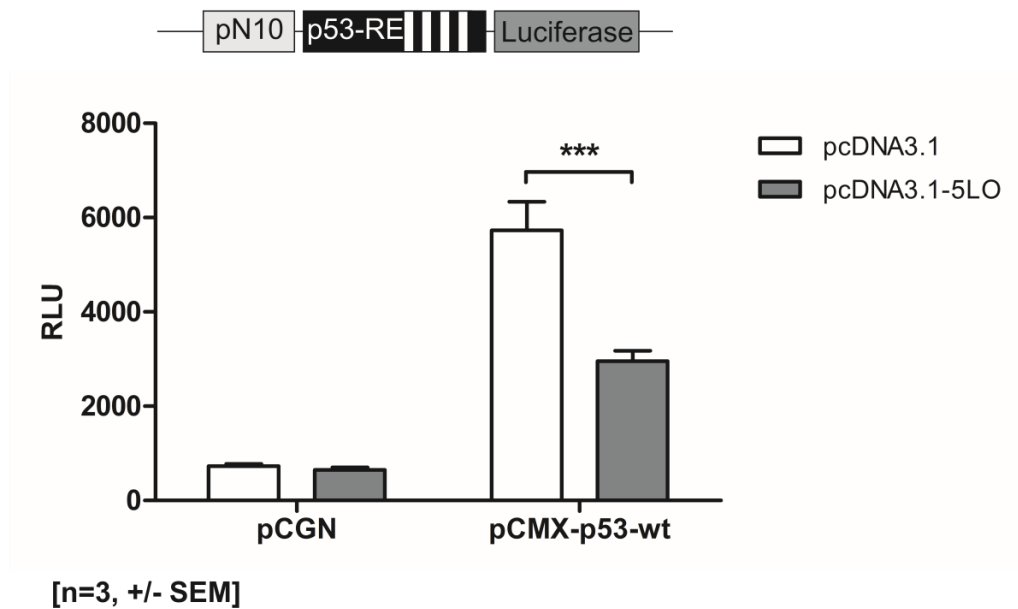
Bei der Analyse p53-regulierter Targetgene konnten, hinsichtlich ihres Expressionsmusters, keine erkennbaren Veränderungen detektiert werden. Während Expressionsunterschiede in den U2OS-Zellen beobachtet werden konnten, war die Expression der untersuchten Gene der 5-LO-überexprimierten Zellen vergleichbar mit der in den Kontrollzellen.

3.7.7 Reportergenanalysen zur Untersuchung des Einflusses der 5-LO auf die 5-LO-Promotor-/p53-Enhancer-Aktivität

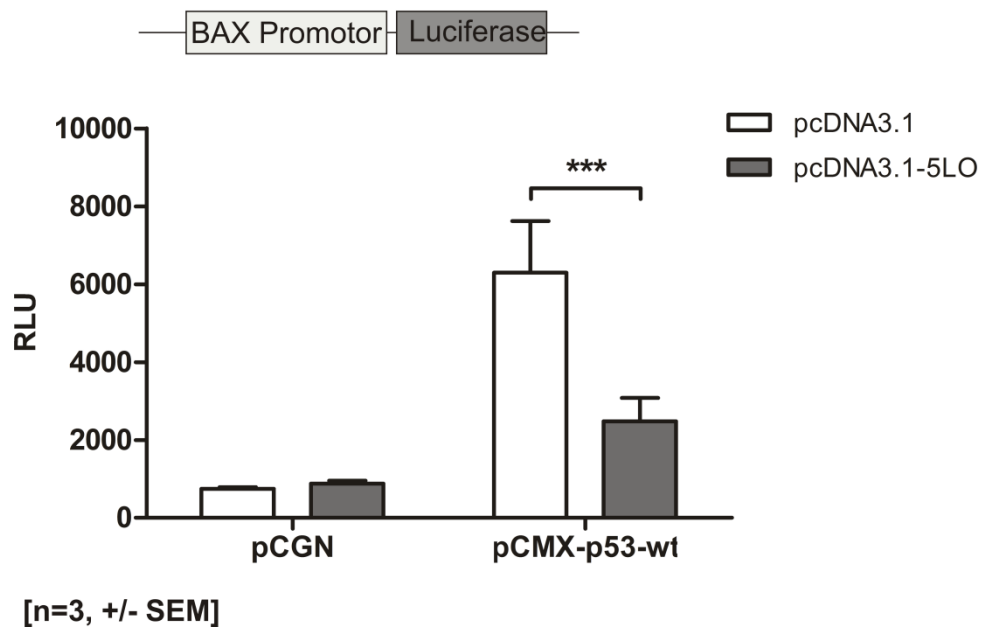
Um den Einfluss von 5-LO auf die Regulation von p53 genauer zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Reportergenkonstrukten sowie mit den Expressionsplasmiden pCMX-p53-wt (Wildtyp p53) und pcDNA3.1-5LO transient kotransfiziert. Mit Hilfe des Luciferase Assay Reporter Kit (Promega) wurde die relative Menge an aktiven Luciferase-Enzym anhand des emittierenden Lichts 40 Stunden nach Transfektion ermittelt (dargestellt in RLU - Relative Light Units). Zusätzlich wurde der

Einfluss der überexprimierten 5-LO auf das p53-regulierte Targetgen Bax-Luc analysiert.
Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Khalil Ahmad durchgeführt.

A



B



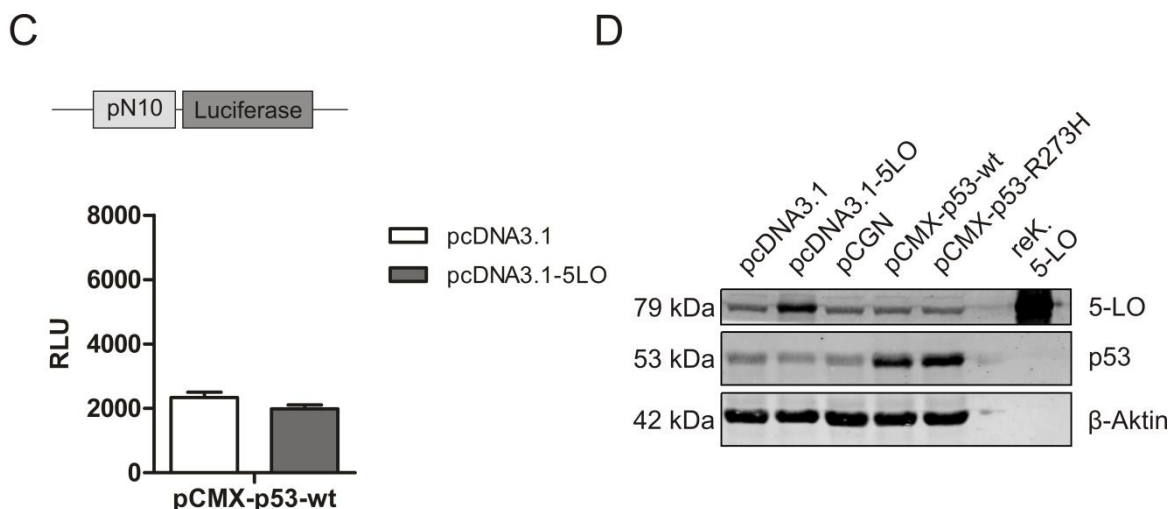


Abbildung 44. Hemmung der transkriptionellen p53-Enhancer-Aktivität durch überexprimierte 5-LO.

Die Zelllinie HEK293T wurde mit den Reportergenkonstrukten pN10, pN10-IntronG-p53 oder Bax-Luc, den Expressionsplasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-5LO, pCGN, pCMX-p53-wt sowie der Renilla-Kontrolle kotransfiziert. 40 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mittels Dual-Glo® Luciferase-Assay-System gemessen. Die Aktivität ist in RLU (Einheit: *relative light units*) angegeben und repräsentiert jeweils drei unabhängige Experimente, *** $p < 0,001$ bezogen auf den Kontrollvektor (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Diese Daten wurden in Kooperation mit Khalil Ahmad erhoben. (A) Kotransfizierte HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden pCGN, pCMX-p53-wt (Wildtyp p53), pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO sowie dem Reportergenkonstrukt pN10-IntronG-p53. (B) Kotransfizierte HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden pCGN, pCMX-p53-wt (Wildtyp p53), pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO sowie dem Reportergenkonstrukt Bax-Luc. (C) Kotransfektion der Zellen mit dem pCMX-p53-wt, pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO sowie dem Reportergenkonstrukt pN10 zur Kontrolle. (D) Western Blot Analyse der Expressionskontrolle der transfizierten HEK293T-Zellen (5×10^6). Die Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-5LO, pCGN, pCMX-p53-wt oder pCMX-p53-R273H transfiziert und nach 40 h extrahiert. Es wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000) und p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle diente β -Aktin und als Positivkontrolle rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

Wie in Abbildung 44A und B zu erkennen ist, führt die gleichzeitige Überexpression der humanen 5-LO und p53 zu einer Reduktion der BAX- und 5-LO-Promotoraktivität. In beiden Transfektionen ist eine deutliche und signifikante Abnahmen bis zu $\leq 50\%$ zu beobachten, *** $p < 0,001$ (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Aktiviertes p53 induziert die Transkription von *ALOX5*, welches wiederum durch die zuvor gezeigte Bindung an p53 dessen Funktion reprimiert, und somit in der Lage ist, direkt die transkriptionelle Funktion von p53 einzuschränken.

3.8 Phänotypische und genotypische Charakterisierung von 5-LO-Knockdown-Zellen

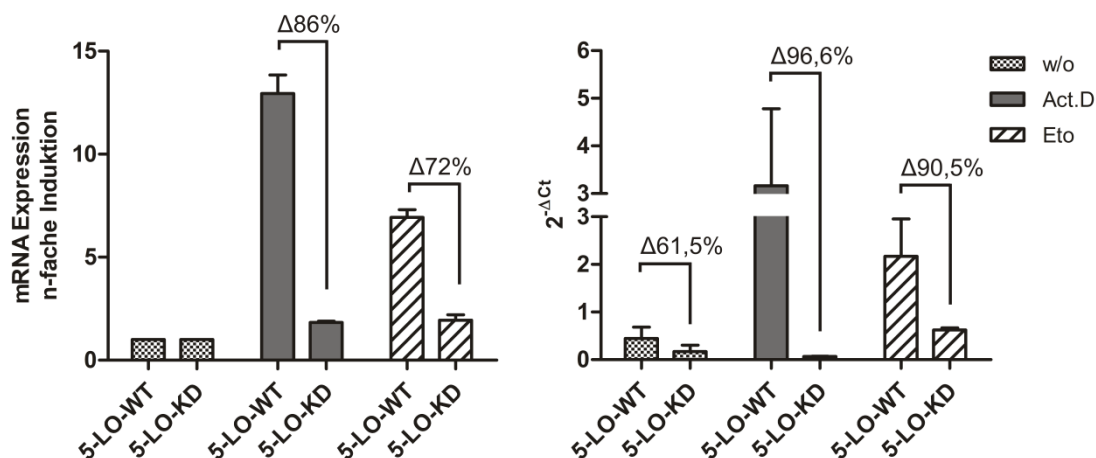
3.8.1 5-LO-Knockdown in U2OS- und HCT116-Zellen

Mit Hilfe von shRNA wurde die 5-LO in U2OS- und HCT116-Zellen herunterreguliert, um anschließend einer phänotypische und genotypische Charakterisierung der Zellen durchzuführen. Zur Herstellung der lentiviralen Partikel wurden HEK293T-Zellen in einem Verhältnis von 10 µg - pLKO.1 bzw. 5-LO-shRNA und 6.5 µg pCMVRΔ8.91 bzw. 3.5 µg pMD2.VSVG kotransfiziert. Die Zellüberstände, welche die viralen Partikel enthielten, wurden nach 24 und 48 Stunden abgenommen und vereint. Anschließend an die Sterilfiltration der Überstände, wurden damit die Zelllinien U2OS und HCT116 stabil, lentiviral infiziert. Die darauf folgende Selektionierung erfolgte mittels Puromycin und die abschließende Behandlung mit Act.D oder Eto.

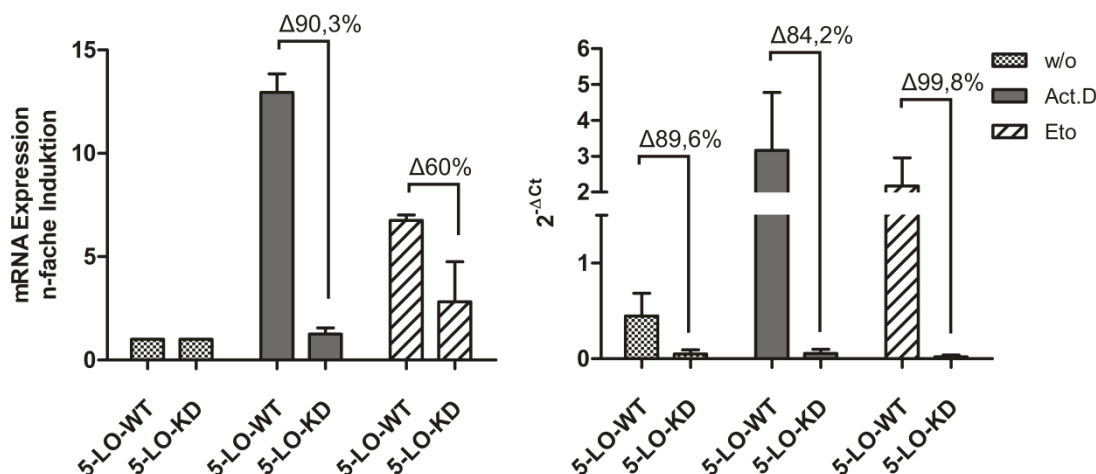
Die Bestimmung der Knockdown-Effizienz sowie die genotypische Charakterisierung der Zellen erfolgten anschließend mittels RT-qPCR sowie Western Blot Analyse. Als Referenzgen für die RT-qPCR diente *HPRT1*.

Die Abbildung 45A gibt die RT-qPCR Ergebnisse zur Kontrolle der 5-LO-Knockdown-Effizienz in U2OS-Zellen wieder. Wie zu erwarten, nahm die Transkriptmenge von *ALOX5* nach shRNA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab. Normiert auf unbehandelte Zellen, konnte eine verminderte Expression um Δ86%, nach der Act.D und Δ72%, nach Eto Behandlung nachgewiesen werden. Die erhaltenen Daten sind zudem als $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werte dargestellt. Hierbei wird die deutliche Abnahme der Transkriptmenge bereits in unbehandelten Zellen ersichtlich (Δ61,5%). Act.D behandelte Zellen zeigten einen Abnahme der *ALOX5*-Transkriptmenge um Δ96,6% und Eto behandelte Zellen um Δ90,5%.

A

ALOX5-Expression in 5LO-Knockdown U2OS-Zellen

B

TP53-Expression in 5LO-Knockdown U2OS-Zellen

[n=2-3, +/- SEM]

Abbildung 45. RT-qPCR-Analyse - Kontrolle der 5-LO-Knockdown-Effizienz in U2OS-Zellen.

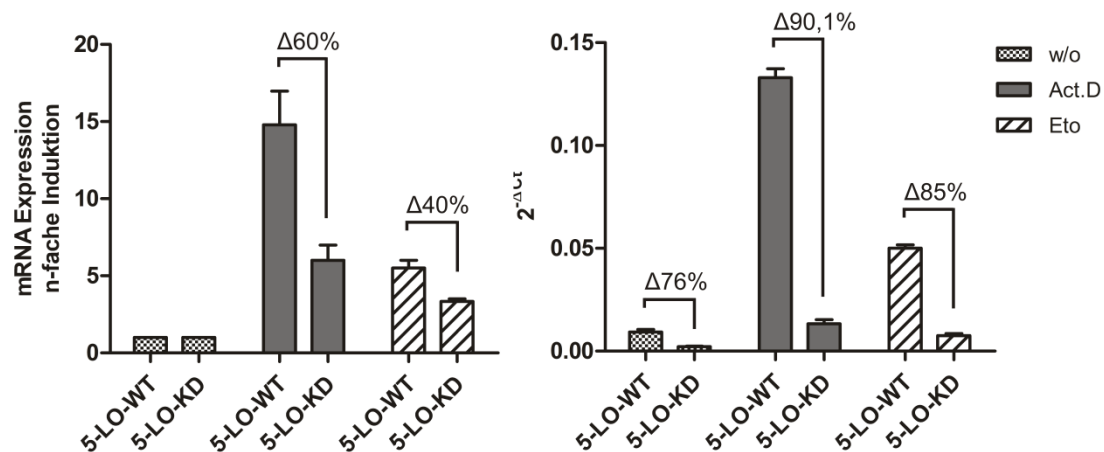
Untersucht wurde die Expression von *ALOX5* (A) und *TP53* (B) in U2OS-5-LO-Knockdown-Zellen. Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro-5-LO-WT). Nach der Selektion wurden die U2OS-Zellen für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μM Eto behandelt. Die Expression von *ALOX5* und *TP53* sind zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta Ct}$ -Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Interessanterweise war nach der shRNA-vermittelten Depletion der 5-LO eine ebenso deutliche Abnahme der Transkriptmenge des Transkriptionsfaktors p53 zu beobachten. Dabei zeigten die U2OS-Zellen eine sichtbare Abnahme der Transkripte von bis zu 90% nach Act.D Behandlung und eine 60%-ige Verminderung nach Eto Behandlung (Normiert auf unbehandelte Zellen). Auch in der Darstellung der RT-qPCR-Werte als $2^{-\Delta Ct}$ -Werte erfolgt eine sichtbare Abnahme der Expression von p53 in den 5-LO-Knockdown Zellen (Abbildung 45B).

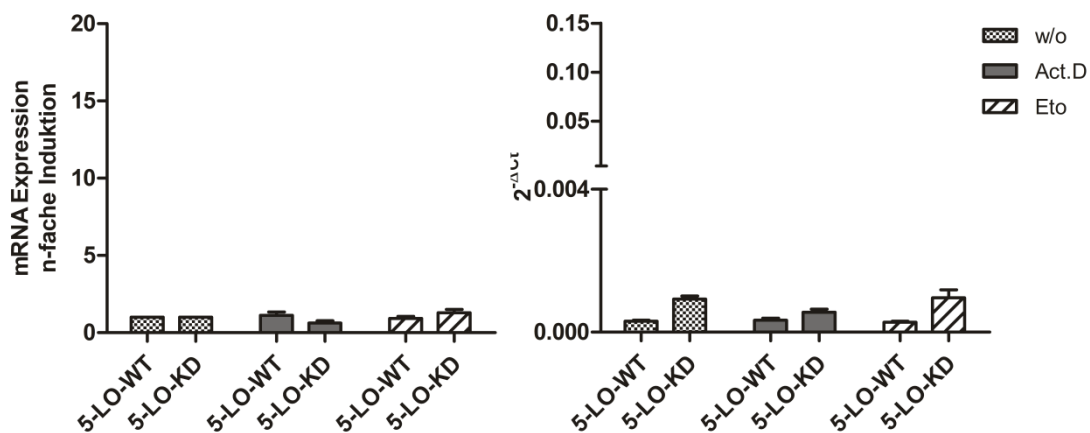
Analog zu diesem Versuch erfolgte der 5-LO-Knockdown in p53 positiven sowie negativen HCT116-Zellen. Auch hierbei wurden die Zellen, mit denen zuvor produzierten, viralen Pseudopartikeln infiziert, selektiert und anschließend mit Act. D und Eto behandelt. In den HCT116p53^{+/+}-Zellen konnte ebenfalls eine deutliche Verminderung der *ALOX5*-Transkripte beobachtet werden (Abbildung 46). Die Abnahme in unbehandelten Zellen lag bei $\Delta 76\%$, wohingegen eine noch stärkere Verminderung in Act.D behandelten ($\Delta 90,1\%$) Eto behandelten Zellen ($\Delta 85\%$) beobachtet werden konnte. In den HCT116p53^{-/-}-Zellen konnte keine signifikante Änderung der Expression festgestellt werden.

A

ALOX5-Expression in 5LO-Knockdown HCT116p53^{+/+}-Zellen



B

ALOX5-Expression in 5LO-Knockdown HCT116p53^{-/-}-Zellen

[n=3, +/- SEM]

Abbildung 46. RT-qPCR-Analyse - Kontrolle der 5-LO-Knockdown-Effizienz in HCT116-Zellen.

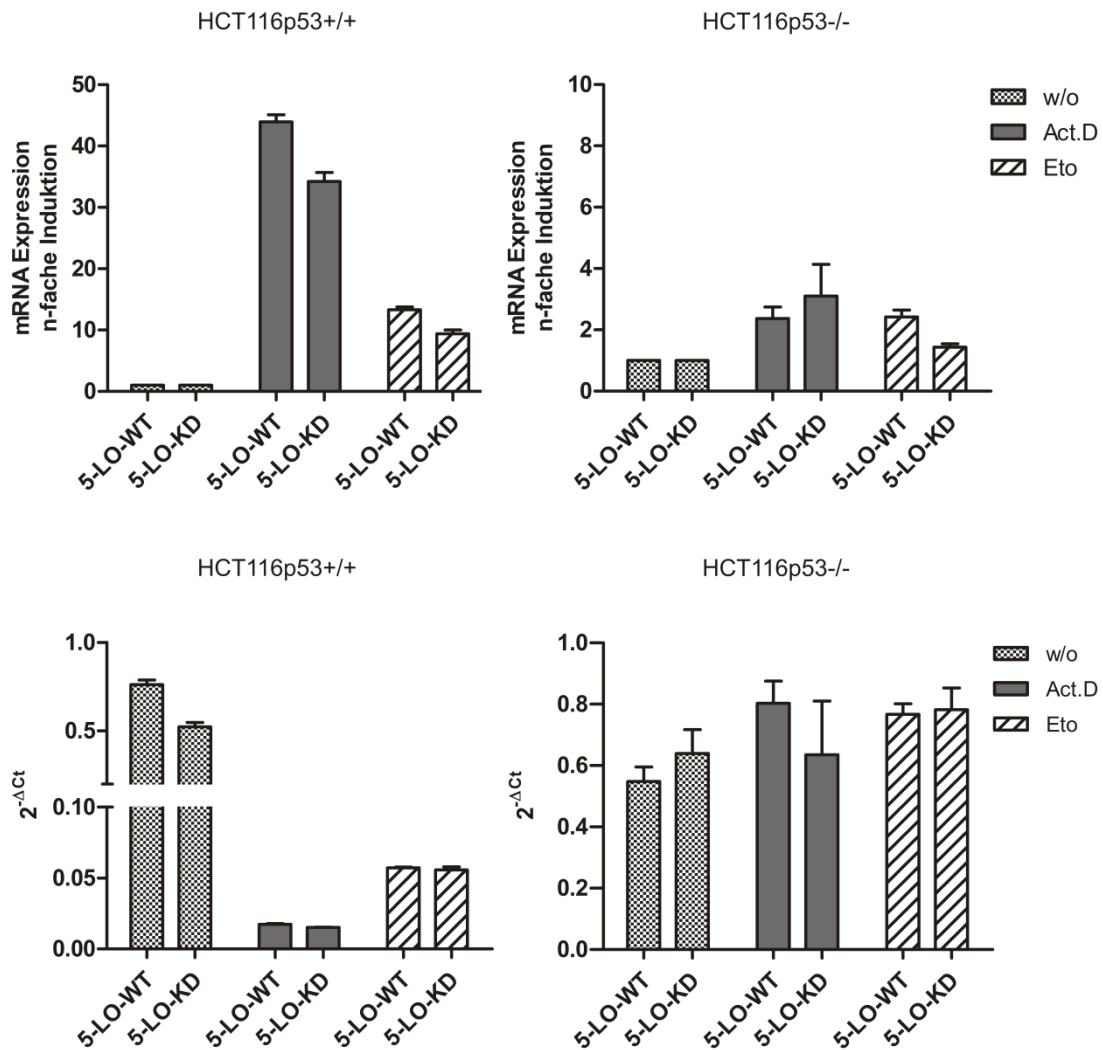
Untersucht wurde die Expression von *ALOX5* zum einen in p53-wt-exprimierenden HCT116p53^{+/+}-Zellen (A) und zum anderen in p53 minus HCT116p53^{-/-}-Zellen (B) Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro,5-LO-WT). Nach der Selektion wurden die HCT116-Zellen für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Die Expression von *ALOX5* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als 2^{-ΔΔCt}-Wert dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

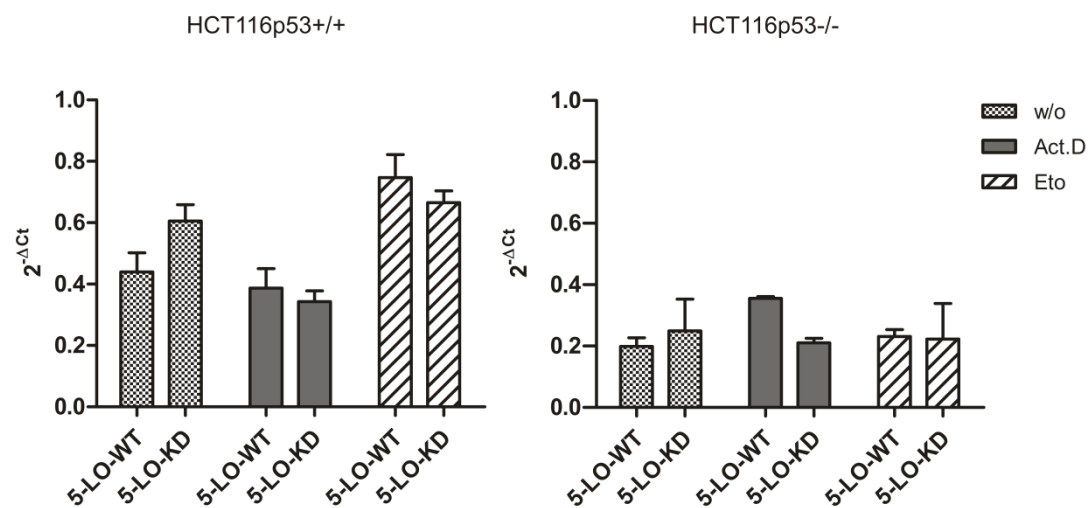
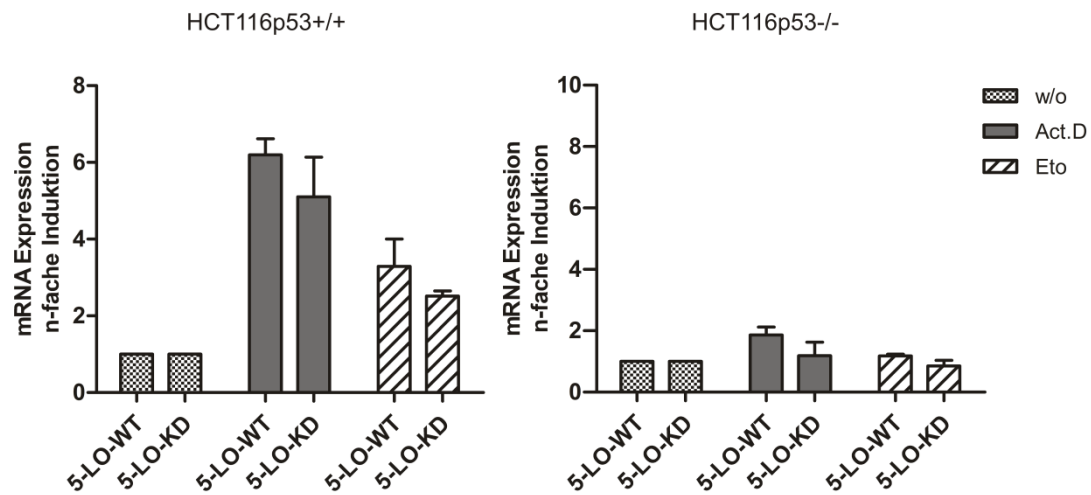
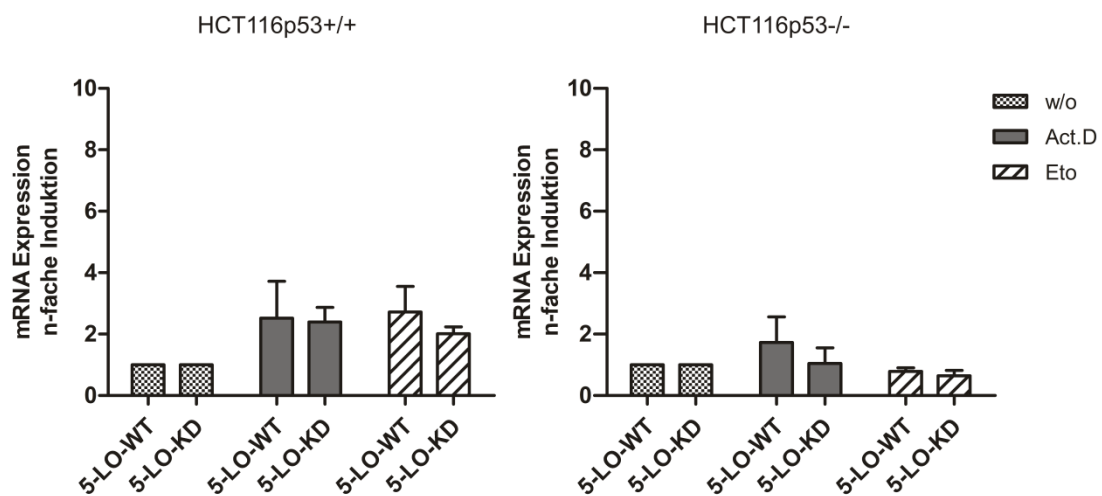
3.8.2 Genotypische Charakterisierung p53-regulierter Targetgene in 5-LO-Knockdown-Zellen.

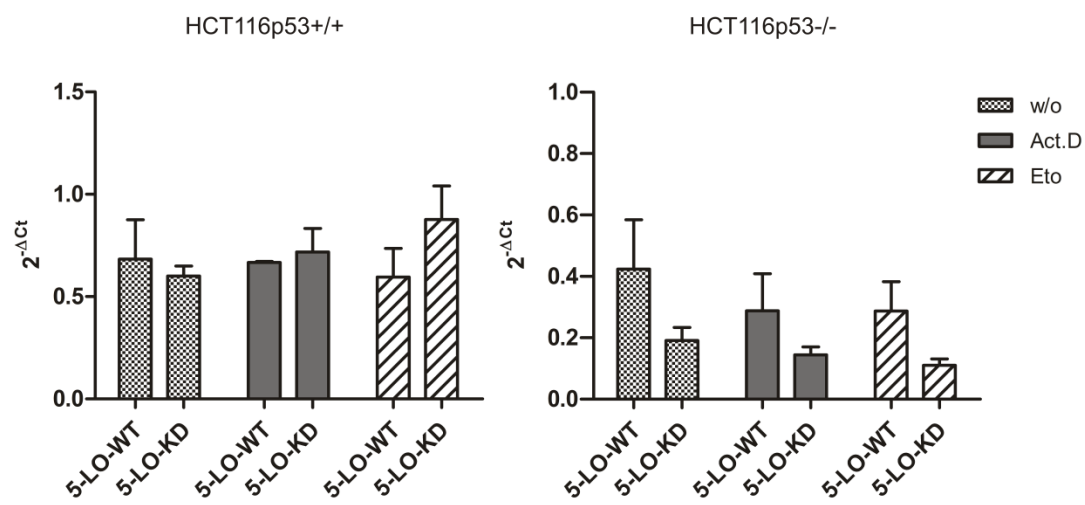
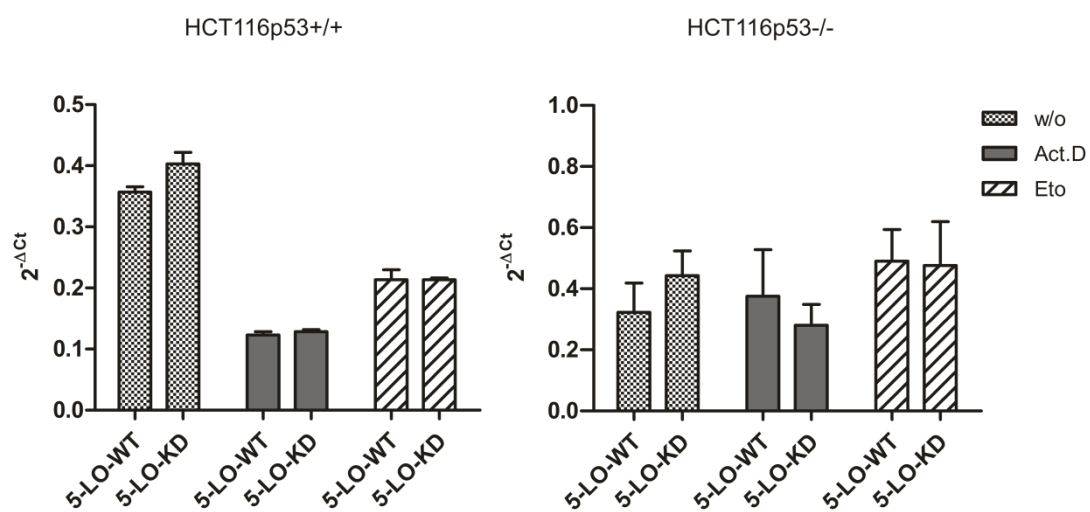
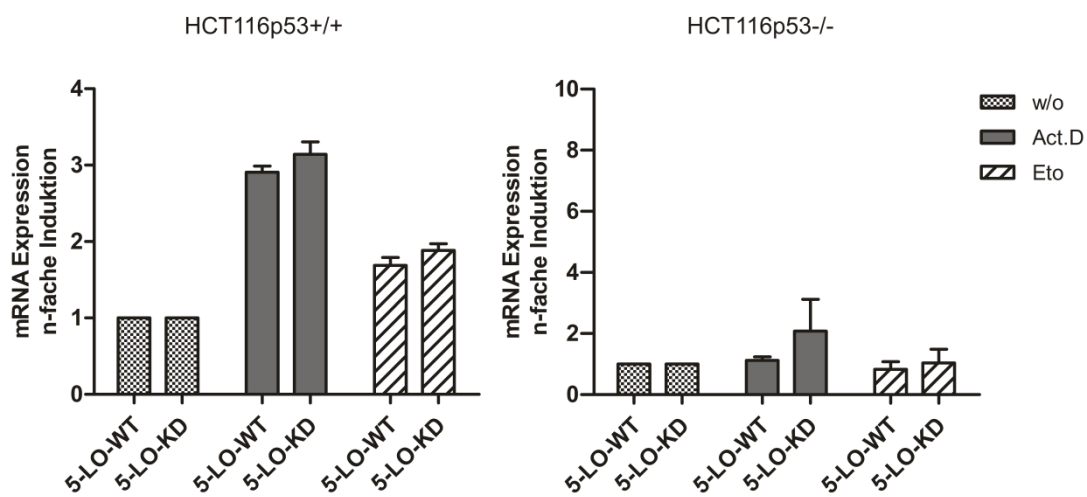
Nachdem eine deutliche Repression der *ALOX5*-Level durch den shRNA-basierten Knockdown erzielt werden konnte, wurden in den folgenden Experimenten Expressionsveränderungen p53-regulierter Targetgene genauer untersucht. Hierbei wurden diverse p53-Targetgene, die unter anderem eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation oder der Apoptose spielen, analysiert. Untersucht wurden die Gene *PUMA*, *BAX*, *Bcl-xL*, *GADD45α*, *MDM2* und *CDKN1A*. Für die Experimente fanden erneut HCT116p53^{+/+}- sowie HCT116p53^{-/-}-Zellen Verwendung in denen, wie bereits beschrieben, die 5-LO mittels shRNA herunterreguliert wurde.

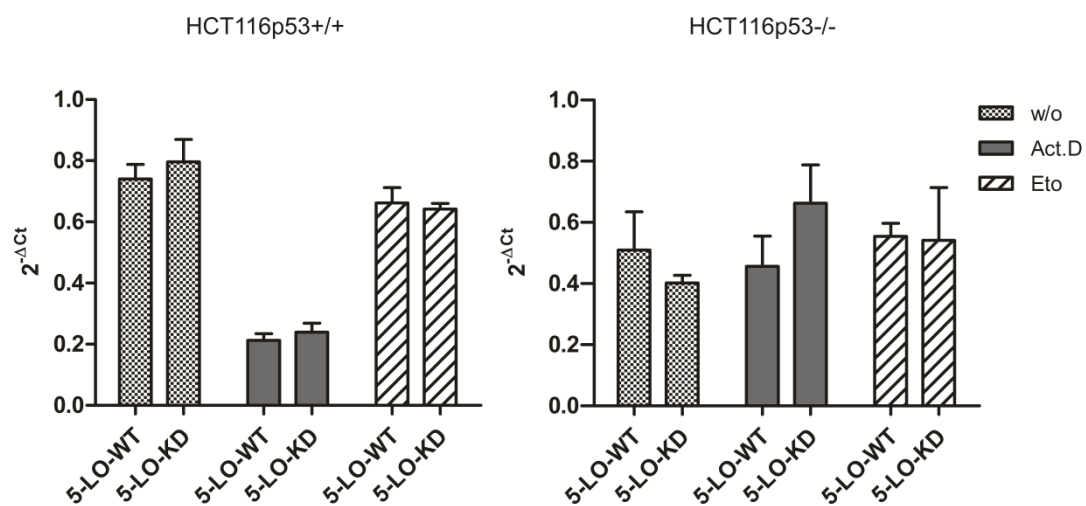
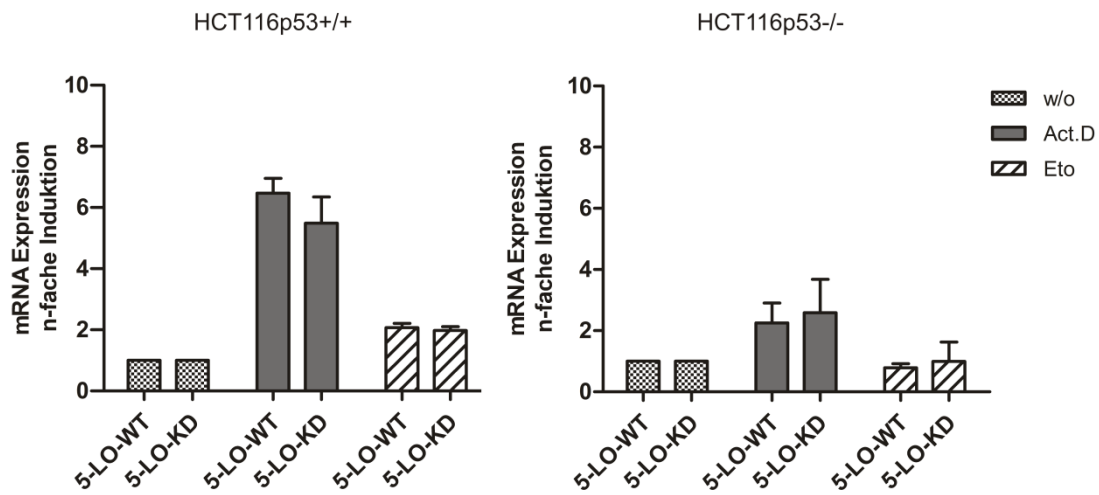
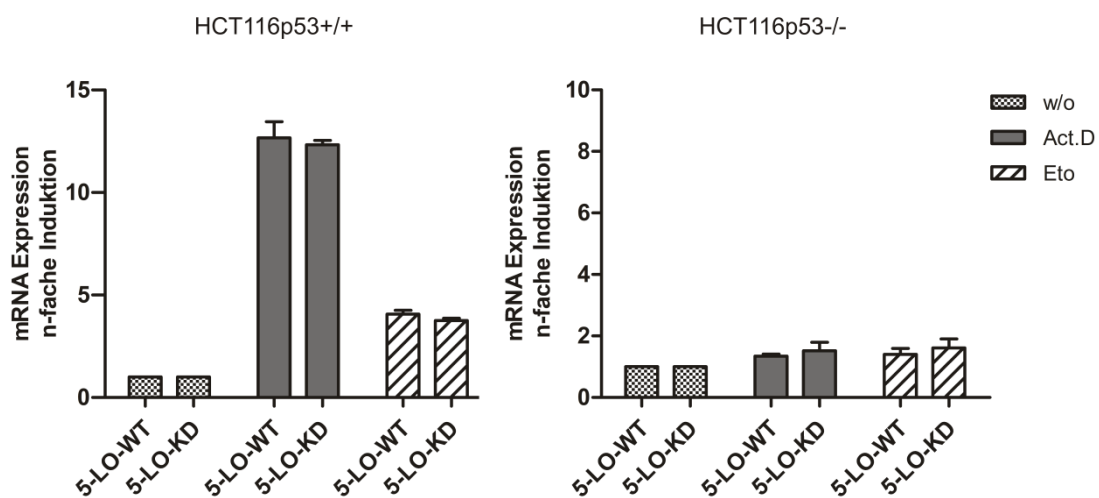
Wie aus der Abbildung 47 ersichtlich ist, ergab die Analyse der Expression keine signifikanten Veränderungen nach 24 Stunden Behandlung im Vergleich zwischen Kontrollzellen (5-LO-WT) und 5-LO-Knockdown in HCT116p53^{+/+}- sowie in HCT116p53^{-/-}- Zellen (5-LO-KD).

CDKN1A-Expression



BAX-Expression**PUMA-Expression**

PUMA-Expression**Bcl-xL-Expression**

GADD45-Expression**MDM2-Expression**

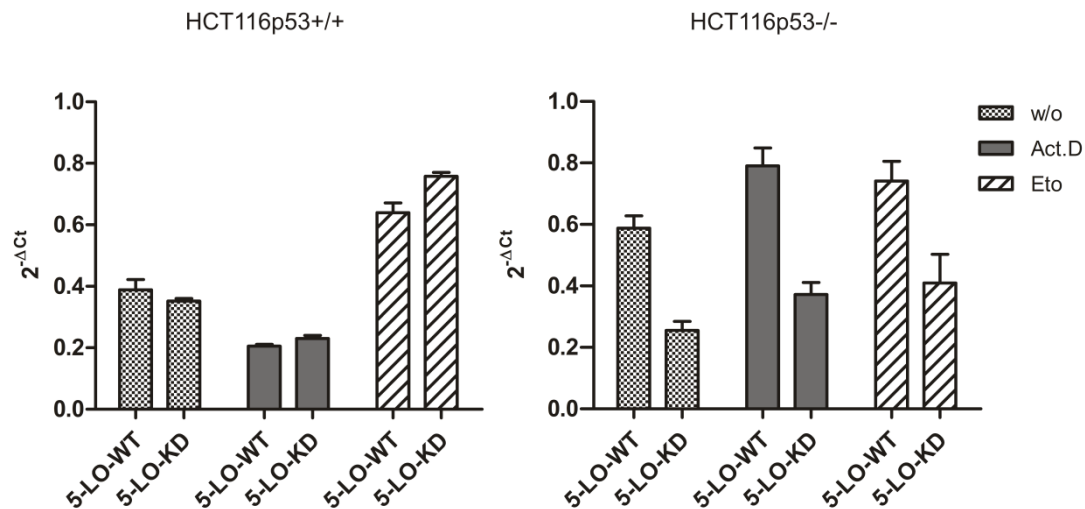
MDM2-Expression

Abbildung 47. RT-qPCR-Analyse p53-regulierter Gene in HCTp53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}-5-LO-Knockdown- Zellen.

Untersucht wurde die Expression p53-regulierter Gene in Kontrollzellen (pLKO.1) und in 5-LO-Knockdown Zellen (5-LO-shRNA). Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, 5-LO-WT). Nach der Selektion wurden die HCT116p53^{-/-}-Zellen für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Dargestellt ist die Expression der p53-regulierten Targetgene *PUMA*, *BAX*, *Bcl-xL*, *GADD45α*, *MDM2* und *CDKN1A* zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als 2^{-ΔCt}-Wert. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Die *TP53*-Expression wurde ebenfalls in 5-LO-Knockdown-HCT116p53^{+/+}-Zellen analysiert. Vergleichbar mit den Daten aus U2OS-Zellen, konnte auch in dieser Zelllinie eine deutliche Abnahme der *TP53*-Transkriptmenge festgestellt werden. Hierbei konnte in der RT-qPCR-Analyse eine Δ79,8%-ige Abnahme nach Act.D und eine Δ59,8%-ige nach Eto Behandlung beobachtet werden. Diese Ergebnisse konnten auch auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Auch hier konnte eine Abnahme der p53-Level nach 5-LO-Knockdown detektiert werden (Abbildung 48).

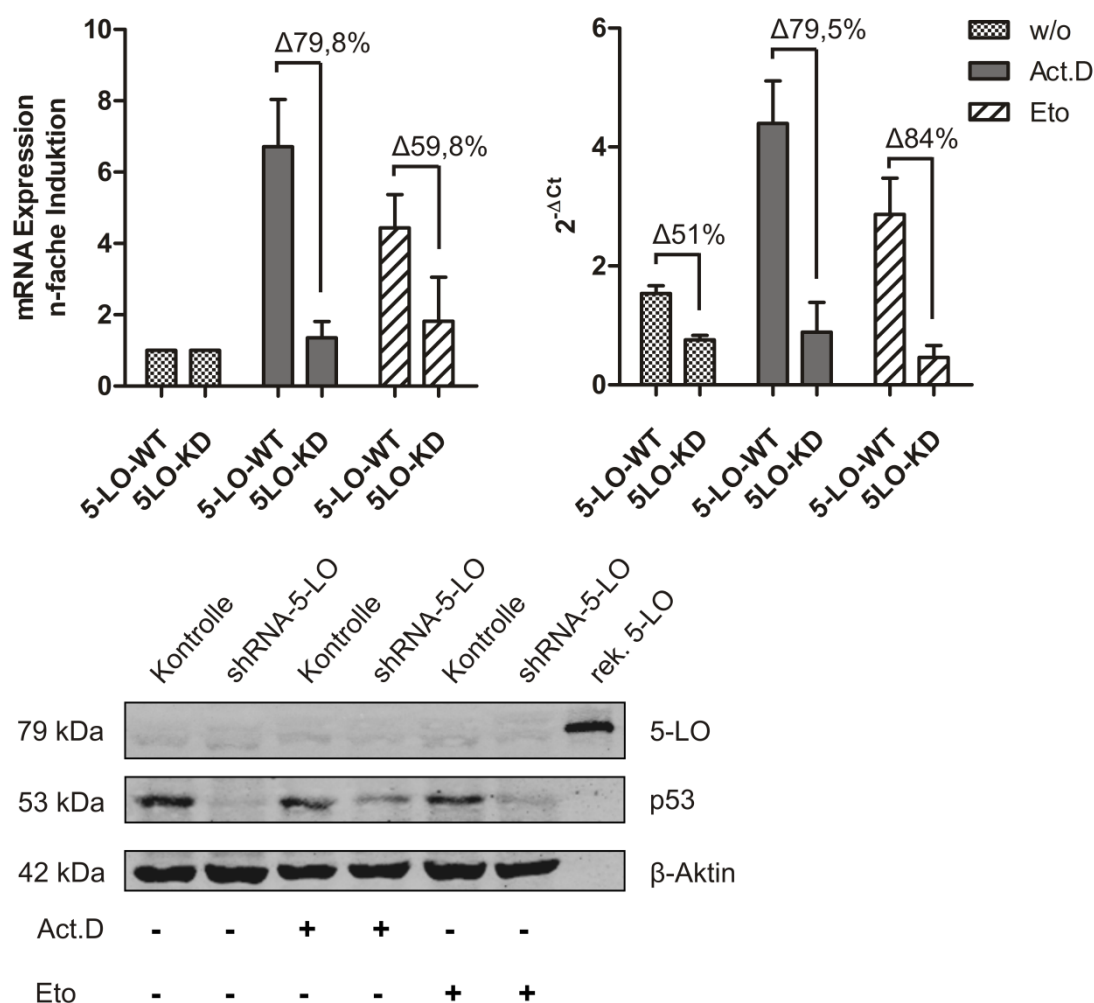


Abbildung 48. RT-qPCR- und Western Blot-Analyse von p53 in HCT116p53^{+/+}-5-LO-Knockdown- Zellen.

Untersucht wurde die Expression von p53 in HCT116p53^{+/+}-Zellen. Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, 5-LO-WT). Nach der Selektion wurden die HCT116-Zellen für 24 bzw. 48 h mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. **(A)** RT-qPCR-Analyse der Expression von *TP53*. Die Expression von *TP53* ist zum einen als n-fache Induktion bezogen auf unbehandelte Zellen und zum anderen als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte dargestellt. Als Referenzgen diente *HPRT1*. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. **(B)** Repräsentative Western Blot-Analyse der Expression von p53 und 5-LO. Die Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt und nach 48 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α-Maus-5-LO, BD, 1:1000) und p53 (α-Maus-p53, DO-1, 1:1000). Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

3.8.3 Phänotypische Charakterisierung von 5-LO-Knockdown-Zellen; Bestimmung der *in vitro*-Zellproliferation mittels eines Kristallviolett-Assays

Durch die Durchführung eines Kristallviolett-Assays sollte ein möglicher Effekt des 5-LO-Knockdowns bezüglich der Zellproliferation bestimmt werden. Der Kristallviolett-Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem die antiproliferative Wirkung proportional zur Zellpopulation bestimmt werden kann. Dazu wurden die 5-LO-Knockdown-Zelllinien in 96-Well-Platten ausgesät und anschließend mit Act.D oder Eto inkubiert. Zur Bestimmung einer Wachstumskinetik wurden die Zellen an fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten analysiert. Da nur lebende Zellen den Farbstoff aufnehmen können, erlaubt der Kristallviolett-Assay eine Aussage über die Vitalität und die Proliferation der untersuchten Zellen.

Die Färbung der Zellen wurde gleichzeitig durchgeführt um mögliche Fehler zu vermeiden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm am Tecan-infinite®M200 (Fa.-Tecan Group Ltd.). Die 5-LO-KD-Zelllinien U2OS, HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-} wurden mit Act.D und Eto für 8, 16, 24, 30 und 48 Stunden behandelt (Abbildung 49 und Abbildung 50).

Die 5-LO-KD-HCT116-Zellen zeigten insgesamt nur eine sehr geringe Veränderung in ihrem Wachstumsverhalten. Bei der Auswertung des Kristallviolett-Assays konnte kein spezifischer Effekt der 5-LO-shRNA im Vergleich zu Kontrolle beobachtet werden. Allerdings konnte in den U2OS-Zellen eine geringfügige Änderung im Wachstumsverhalten zwischen 5-LO-KD und 5-LO-Kontrollzellen erfasst werden. Hierbei war zu sehen, dass die Zellen mit dem 5-LO-Knockdown etwas schlechter wuchsen als die Kontrollzellen. Dieser Effekt ließ sich sowohl in Act.D- als auch in Eto-behandelten Zellen nachweisen.

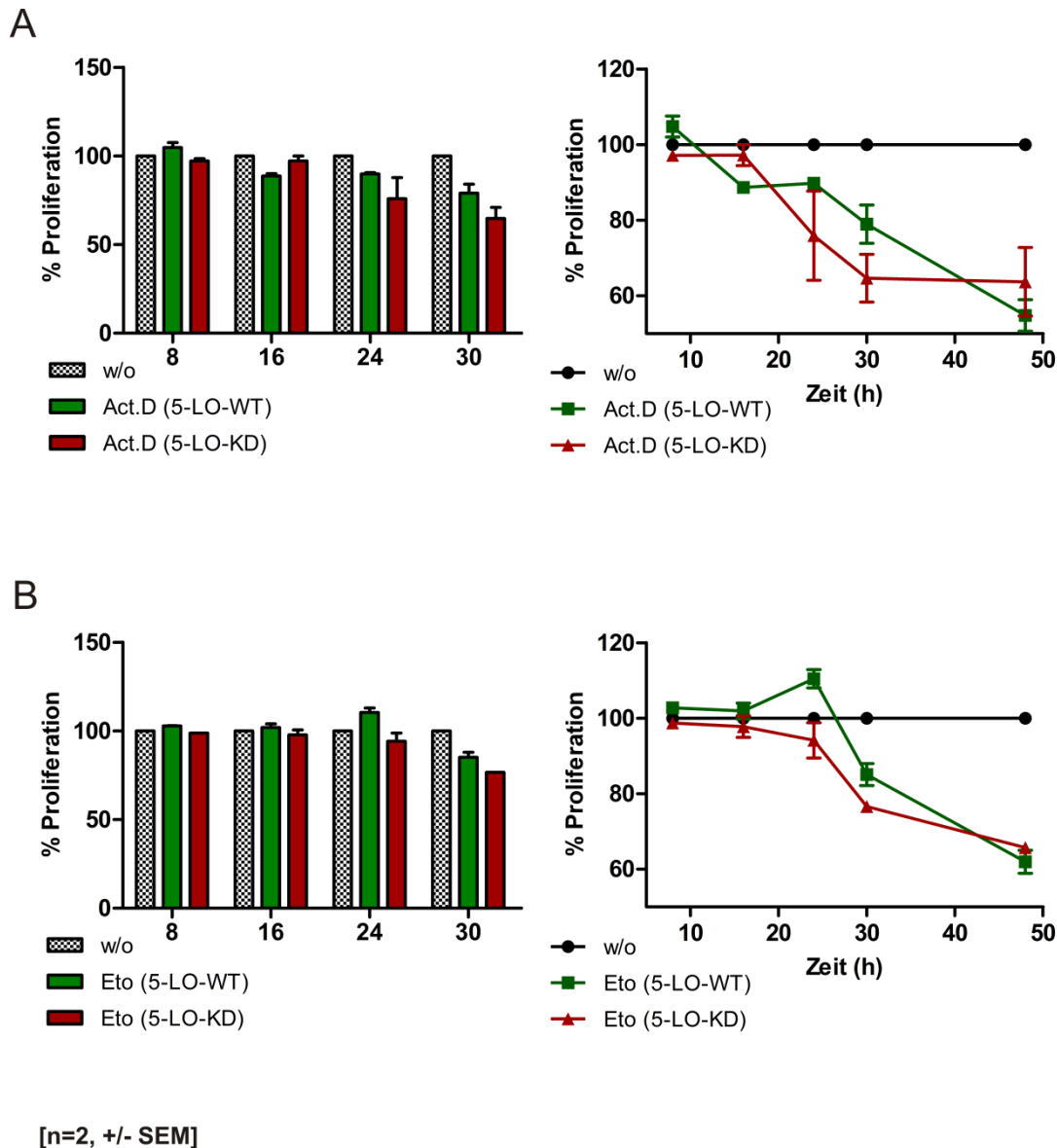


Abbildung 49. Einfluss des 5-LO-Knockdowns auf das Wachstum von U2OS-Zellen.

Jeweils 1×10^4 U2OS-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt. Am Folgetag wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit jeweils 200 μ l 5% Formaldehyd für 5 min fixiert. Nach dem Entfernen des Formaldehyds wurden die Zellen 1 x mit 200 μ l PBS gewaschen und mit 50 μ l der 50%-igen Kristallviolett-Lösung für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, bevor sie mit 100 μ l einer 33%-igen HOAc-Lösung für 5 min unter Schütteln inkubiert wurden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.). **(A)** Darstellung des Zellwachstums nach Act.D Behandlung. **(B)** Darstellung des Zellwachstums nach Eto Behandlung. 5-LO-Knockdown-Zellen wurden mit 5-LO-Kontrollzellen verglichen und auf untransfizierte Zellen (100%) normiert. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente.

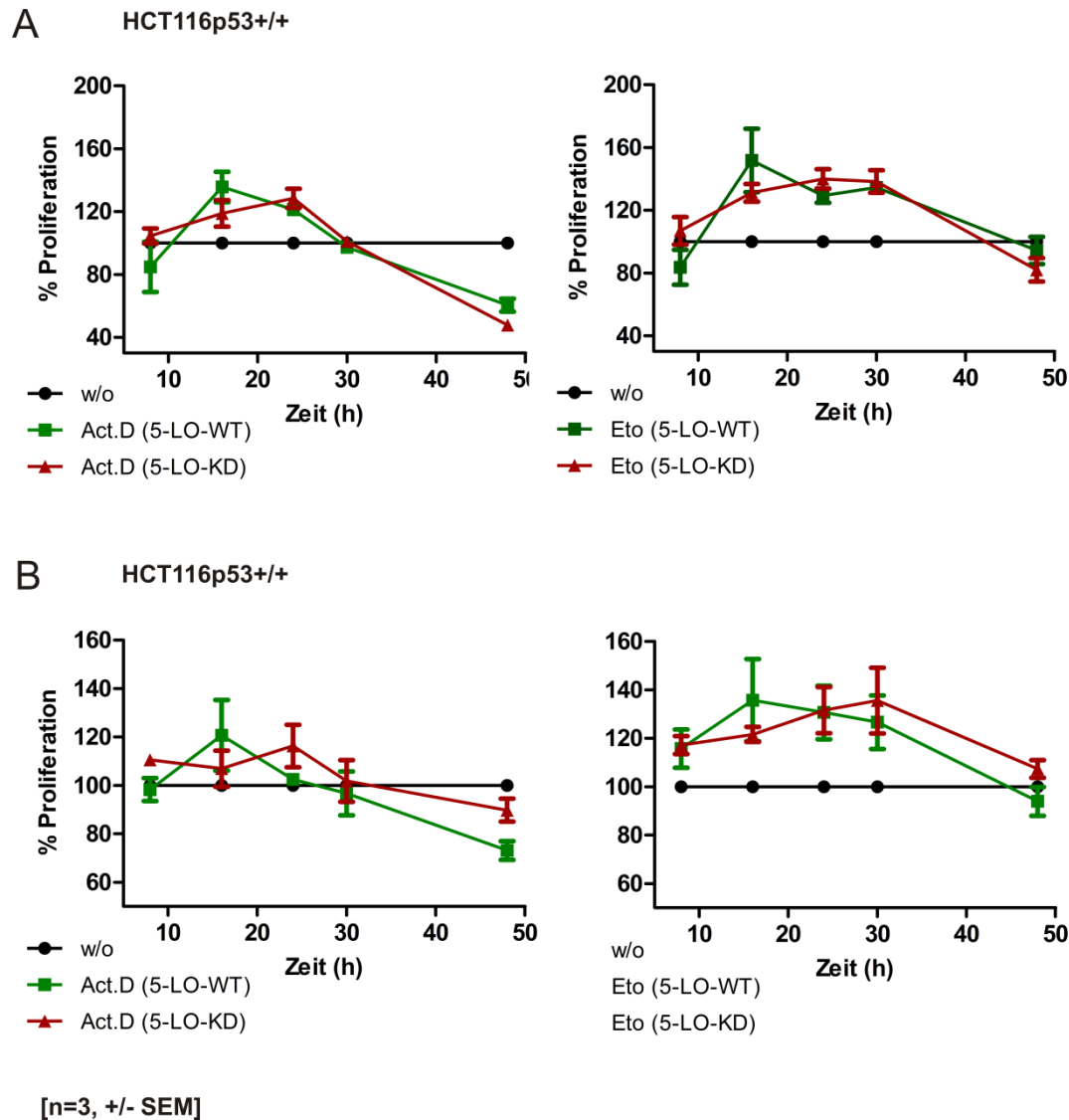


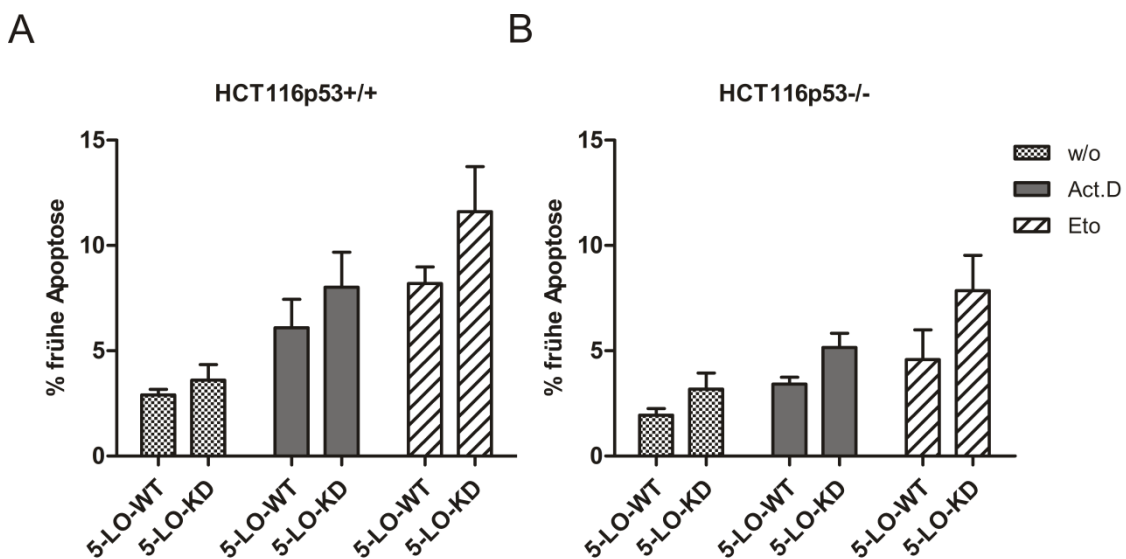
Abbildung 50. Einfluss des 5-LO-Knockdowns auf das Wachstum von HCT116p53-Zellen.

Jeweils 5×10^4 HCT116-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt. Am Folgetag wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit jeweils 200 μ l 5% Formaldehyd für 5 min fixiert. Nach dem Entfernen des Formaldehyds wurden die Zellen 1 x mit 200 μ l PBS gewaschen und mit 50 μ l der 50%-igen Kristallviolett-Lösung für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, bevor sie mit 100 μ l einer 33%-igen HOAc-Lösung für 5 min unter Schütteln inkubiert wurden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.). **(A)** Darstellung des HCT116p53^{+/+}-Zellwachstums nach Act.D und Eto Behandlung. **(B)** Darstellung des HCT116p53^{+/+}-Zellwachstums nach Act.D und Eto Behandlung. 5-LO-Knockdown-Zellen wurden mit 5-LO-Kontrollzellen verglichen und auf untransfizierte Zellen (100%) normiert. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

3.8.4 Bestimmung der frühen Apoptose mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung

Bereits im Vorfeld konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden, dass überexprimierte 5-LO erhöhte proliferierende- und anti-apoptotische Eigenschaften aufweist [152,259]. Aus diesem Grund wurde die Apoptoserate in den 5-LO-Knockdown Zellen überprüft. Hierzu wurden die Zellen mittels AnnexinV-FITC/PI gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Nekrotische und apoptotische Zellen werden hierbei durch die Färbung mit dem AnnexinV-FITC sichtbar, wohingegen Zellen deren Zellmembran beschädigt ist (nekrotische Zellen) von PI erfasst werden. Lebende Zellen sind dagegen AnnexinV-FITC-negativ und PI-negativ.

Darüber hinaus wurde die Apoptoserate der Zellen nach der Behandlung mit Act.D (arretierend) und Eto (apoptoseinduzierend) untersucht. Act.D wurde in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt, bei der zuvor in der Zellzyklusanalyse ein deutlicher G₀G₁-Arrest gezeigt werden konnte. Das apoptoseinduzierende Eto kam in einer Konzentration von 10 µM zum Einsatz. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurden die apoptotischen Zellen (frühe Apoptose) bestimmt und über die Software MotFit LT-V3.3.11 (MAC) quantifiziert. Die ausgewertete FACS-Analyse wurde in Form eines Balkendiagrammes dargestellt und bezieht sich ausschließlich auf die frühe Apoptose (Abbildung 51).



C

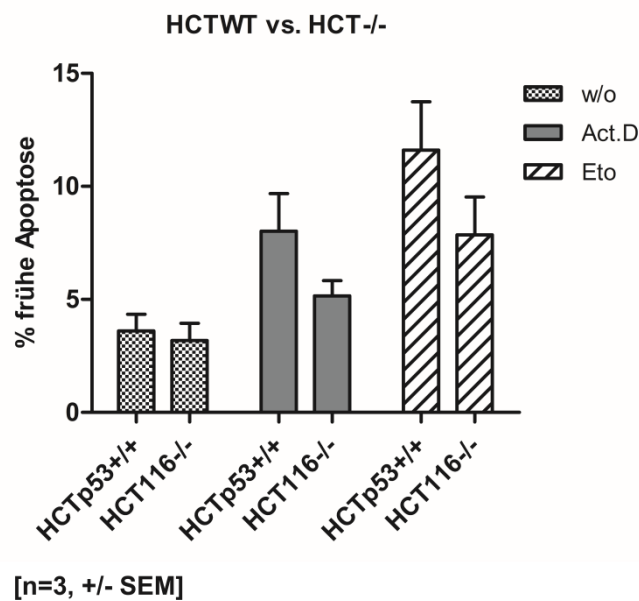


Abbildung 51. Erfassung der frühen Apoptose in 5-LO-Knockdown-Zellen.

(A) Frühe Apoptose in HCT116p53^{+/+}-Zellen. (B) Frühe Apoptose in HCT116p53^{-/-}-Zellen. (C) Vergleich zwischen HCT116p53^{+/+}- und HCT116p53^{-/-}-Zellen. Nachdem die Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, 5-LO-WT). Nach der Selektion wurden die HCT116-Zellen 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Davon wurden 1x10⁵ Zellen in AnnexinV-Bindpuffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 2 µl AnnexinV-FITC (5 µg/ml) sowie 10 µl PI-Lösung (Stammlösung 50 mg/ml) für 15 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung erfolgte die Zugabe von 400 µl Annexin-Bindpuffer. Es wurden 10000 Zellen vermessen. Die gemessenen Zellpopulationen wurden mit Hilfe der Software MotFit LT-V3.3.11 (MAC) quantifiziert und ausgewertet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Der Anteil früh-apoptotischer Zellen war bei den untersuchten Zelllinien HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-} nach dem 5-LO-Knockdown höher als bei den Kontrollzellen (5-LO-WT). Die Bestimmung der Apoptose mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung zeigte zudem, dass nach der Behandlung mit Act.D oder Eto der Anteil früh-apoptotischer Zellen noch einmal zunahm. Im direkten Vergleich zwischen HCT116p53^{+/+}- und HCT116p53^{-/-}-Zellen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass Zellen welche p53-positiv sind einen höheren Anteil an früh-apoptotischen Zellen aufwiesen als p53-negative Zellen.

4 Diskussion

4.1 Pharmakologie von Actinomycin D und Etoposid

Seit mehr als 60 Jahren werden Zytostatika wie Act.D oder Eto zur Chemotherapie bei Krebserkrankungen eingesetzt. Sie beeinflussen den Metabolismus, inhibieren die Zellproliferation und aktivieren körpereigene Kontrollmechanismen die zum programmierten Zelltod führen [260–264]. Einer der wichtigsten Faktoren zur Regulation der Apoptose ist der Tumorsuppressor p53. Behandlungen mit den beschriebenen Zytostatika, führen zu einer p53-aktivierenden Signalkaskade, bei der gezielt Gene für die DNA-Reparatur bzw. Apoptose reguliert werden [265,266]. Es ist bekannt, dass Tumorpatienten mit mutiertem p53 schlechter auf Bestrahlungs- und Chemotherapien ansprechen. Solche Tumoren weisen zudem erhöhte Proliferations- und Metastasierungsraten auf [127,267]. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung der verwendeten Zytostatika Act.D und Eto auf den Zellzyklus charakterisiert. Dazu wurden die Zellen bewusst durch diese Substanzen geschädigt, um eine p53-vermittelte Stressantwort zu induzieren. Durch eine Zellzyklusanalyse konnte bestätigt werden, dass die Behandlung mit Act.D zu einem Arrest der Zellen in der G₀G₁-Phase führt, wohingegen Eto einen charakteristischen Arrest in der G₂M-Phase sowie einen Anstieg an apoptotischen Zellen zeigt (Abbildung 12) [265,266]. In weiteren Versuchen wurde p53 auf Protein- sowie auf RNA-Ebene charakterisiert. Hierbei konnte eine signifikante Induktion und Akkumulierung des Tumorsuppressors nach beiden Behandlungen bestätigt werden (Abbildung 13). Die verschiedenen Zytostatika sollen, je nach Aktivierung der Signalkaskaden, eine breite Spannweite an bekannten sowie potenziell neuen p53-Targetgenen aktivieren [268].

4.2 Transkriptionelle Regulation der 5-Lipoxygenase durch den Transkriptionsfaktor p53

4.2.1 Identifikation von *ALOX5* als neues Targetgen von p53

Durch die Kombination aus Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung - ChIP-Seq - konnte ein genomweites Bindemuster für p53 *in vivo* erstellt werden. Diese Methode erlaubt die Identifizierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen,

wie die Klassifizierung von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder Histonmodifikationen. In den letzten Jahren wurden herkömmlichen Microarrays oder ChIP-on-Chip Methoden vermehrt durch mehrfach angewandte, sequenzbasierte Methoden wie dem Deep-Sequenzierung (ChIP-seq-Analyse) ersetzt. Zu den Vorteilen dieser Methode zählen die stark vereinfachten Arbeitsschritte, geringe Ausgangskonzentrationen sowie der Hochdurchsatz der Illumina Technologie [106,269]. Die Definition der Bindestellen erfolgt anhand einer signifikanten Anreicherung von Sequenz-Reads gegenüber dem Hintergrundsignal desselben Locus. Zur Identifizierung der p53-Bindestellen im Datensatz wurde die Software ELAND software (Illumina) verwendet [252]. Die Kombination von insgesamt vier genomweiten Datensätzen erlaubte uns die Identifikation des *ALOX5* Gens, das durch p53 sowohl gebunden als auch transkriptionell reguliert wird. Durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper (DO-1, p53-pS46, p53-AcK320 und p53-AcK-382) konnte die Bindung von p53 zusätzlich bestärkt werden. Wie in Abbildung 16A zu sehen ist befindet sich die Bindung von p53 nicht im regulatorischen Promotorbereich sondern innerhalb der Intron-G Sequenz (Intron 7). Bei genauerer Betrachtung des Abschnitts konnten wir eine vorständig konservierte p53-Bindungsstelle, bestehend aus vier Kopien einer palindromischen Sequenz „RRRCWWGYYY“ welche durch kleine Spacer (0-18 bp) separiert werden, nachweisen (Abbildung 16B) [73]. Die Konsensussequenz ist vergleichbar zu bereits bekannten Response-Elementen die für p53 charakterisiert wurden. Abbildung 52 zeigt Konsensussequenzen von klassischen Targetgenen die von p53 reguliert werden. Deutlich erkennbar sind die stark konservierten p53-Bindungsstellen (RE) untereinander (Abbildung 52).





























		(Spacer)			Konsensus-Sequenz
		-			<i>BAX</i>
		ac			<i>TIGAR</i> (C12orf5)
		-			<i>BCC3</i> (PUMA)
		-			<i>GADD45</i>
		-			<i>CDKN1A</i> (p21)
		-			<i>MDM2</i>
GAACA	TGTCA		GAACA	TGTCA	<i>ALOX5</i>

Abbildung 52. Konsensussequenzen von klassischen p53-regulierten Targetgenen.

Dargestellt sind die konservierten p53-Bindungsstellen der bekannten Targetgene *BAX* (bcl-2-like protein 4), *TIGAR* (*TP53*-inducible glycolysis and apoptosis regulator), *BCC3* (Bcl-2-binding component 3), *GADD45* (DNA-damage-inducible protein), *CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) und *MDM2* (Mouse double minute 2 homolog) im Vergleich zu *ALOX5* (5-Lipoxygenase). Modifiziert nach [270].

Mit Hilfe einer vorangegangenen Studie konnten mittels ChIP-Seq ca. 2.132 Bindestellen nach Act.D und 2.920 nach Eto Behandlung für p53 detektiert werden (Datensatz für p53-DO1 ChIP-Seq) [252]. Die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die Intron-G Sequenz des *ALOX5* Gens wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation zusätzlich validiert. Hierbei konnte eine signifikante Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die Targetsequenz ermittelt werden. Die Bindung des Proteins war um ein Vielfaches stärker nach den Behandlungen mit Act.D und Eto ($***p < 0,001$ unb vs. Act.D bzw Eto) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Targetgene *CDKN1A* und *BAX*, die zur Kontrolle mitgeführt wurden, zeigten wie erwartet ebenfalls eine starke Bindung von p53 an die Promotorregionen (Abbildung 17A). Die Bindung von p53 konnte sowohl mit einem α -p53 DO-1 Antikörper als auch mit einem α -p53-K320 Antikörper bestätigt werden. Da die Bindung nicht im regulatorischen Promotorbereich des *ALOX5* Gens stattfindet, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der spezifischen Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle um ein Enhancer-Element handelt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die komplette Konsensussequenz, bestehend aus den vier palindromische Abschnitten, hinter den *ALOX5*-Promotor eines Luciferase-Konstrukts kloniert und die Transkriptionsaktivität durch p53 überprüft. Dabei konnten zeigen werden, dass die Bindung von p53 zu einer

signifikanten Verstärkung der Aktivität führt. Im Gegensatz dazu konnte in Versuchen mit der transfizierten p53-Variante R273H (Mutation in der DNA-Binderegion) keine signifikante Induktion der Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 33). Obwohl die Bindung von p53 an das Gen *ALOX5* nachgewiesen werden konnte, bleiben einige Fragen offen. Die ermittelten Daten stützen die Annahme, dass p53 als distaler Enhancer der *ALOX5*-Expression fungiert. Mittels der 3C-Methode (*chromosome conformation capture*) könnte die direkte Assoziation von *cis*-regulatorischen Elementen zu den durch sie regulierten Genen nachgewiesen werden [271,272]. Diese Methode könnte die Loop-Hypothese zusätzlich bestätigen. Auch aus einer anderen aktuellen Studie geht hervor, dass *cis*-Elemente, die sich in der Nähe des Gens befinden, zu einer signifikanten Verstärkung der transkriptionellen Aktivität beitragen können [107]. Dazu wurden die Datensätze verschiedenen ChIP-Seq-Studien untereinander verglichen und die Gene mit proximalen oder distalen p53-RE genauer untersucht. Vergleichbar mit den beschriebenen Experimenten wurde das p53-RE hinter den 5-LO-Promotor des jeweiligen Gens kloniert und die Aktivierung bzw. Reprimierung charakterisiert. Interessanterweise führten die p53-RE zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivitäten von 5-LO und BAX (Abbildung 33). Ferner konnte keine signifikante Veränderung bei der Transfektion mit mutiertem p53 detektiert werden [118,119]. Die Anwesenheit des p53-RE beeinflusst somit die räumliche Konformation des Gens, wodurch es zu einer Anlagerung von p53 an die Transkriptionsmaschinerie kommt und die *ALOX5*-Expression gesteigert wird.

4.2.2 Mögliche p53-Interaktionspartner der Transkriptionsmaschinerie von *ALOX5*

Des Weiteren ist bekannt, dass p53 mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die auch an der Regulation der 5-LO beteiligt sind, interagieren kann und die Transkription dadurch beeinflusst. Beispiele dafür sind Sp1, PU.1 und Egr-1. Sie zählen zu den bekanntesten und bereits beschriebenen Interaktionspartnern von p53 [273–275]. Sp1 ist ebenso wie p53 ein dualer Aktivator und Repressor der Transkription verschiedener Targetgene. Innocente *et al.* konnten bereits zeigen, dass die direkte Bindung von Sp1 und p53 die Regulation und Repression von Cyclin B1 beeinflussen [276]. Dabei fiel auf, dass nur Wildtyp p53 und nicht mutiertes p53 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 interagieren kann [277]. Auch in andere Studien konnten der Einfluss von Sp1 gegenüber p53 beschrieben werden. Durch eine ChIP-Seq-Analyse konnte Sp1 als wichtiger Faktor bei der Regulierung

pro-apoptotischer Targetgene charakterisiert werden. Hierbei führt die Bindung von Sp1 an klassische RE von p53 zu einer Repression dieser Targetgene [274,278]. Andererseits kann Sp1 auch als Aktivator fungieren. Die Interaktion zwischen p53 und Sp1 führt am Beispiel von p21 zu einer transkriptionellen Aktivierung des Gens. Dabei bindet Sp1 an p53 und steigert dadurch die Promotoraktivität [276]. Ein weiterer Bindungspartner von p53 ist der Transkriptionsfaktor PU.1. Dieser spielt bei der Differenzierung von B-Lymphozyten eine wichtige Rolle und kann durch die Bindung mit p53 dessen transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Die Bindung von PU.1 mit der p53 Familie (p53, p63 und p73) zeigte eine starke Repression in der Aktivierung von Genen die sowohl in der Zellzykluskontrolle als auch in der Apoptose involviert sind [275]. Da keine Studien über PU.1 und p53 vorliegen, in denen eine positive Aktivierung von Targetgenen beschrieben ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Regulierung und Aktivierung der 5-LO nicht synergetisch zwischen p53 und PU.1 abläuft. Eine weitaus bedeutendere Rolle scheint dagegen Egr-1 zu spielen. Diesem Transkriptionsfaktor wird eine wichtige regulatorische Funktion in den Signalkaskaden der Proliferation, dem Zellzyklusarrest, der Differenzierung und dem programmierten Zelltod zugeschrieben. Vergleichbar mit den Studien über Sp1 konnte für Egr-1 eine direkte Bindung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ausschließlich für intaktes p53 (wtp53) nachgewiesen werden. Punktmutationen führen dahingegen zu einem Verlust der Bindung zwischen beiden Transkriptionsfaktoren [273].

Zudem konnte durch eine ChIP-on-Chip Genom-Analyse der Vitamin-D3-Rezeptor (VDR) als ein potentiell Targetgen von p53 beschrieben werden. Dabei konnten sowohl in der Promotor- als auch in der Intronsequenz (Intron 1; Position 4,695-4,704), Konsensussequenzen für p53 identifiziert werden [279]. Die direkte Regulation des VDR durch p53 führt, unter anderem, zu einer Inhibition des Zellwachstums maligner Zelltypen aus Brust-, Darm-, Haut- oder Hirntumoren [280–283]. Der physiologisch aktive Metabolit von Vitamin D3, 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 (Calcitriol), bindet mit einer hohen Affinität an den VDR, wodurch es zu einer Aktivierung und Dimerisierung mit RXR (*retinoid X receptor*) kommt. Das Heterodimer bindet wiederum an VDRE und bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung der Vit.D3 Targetgenen [281,284,285]. Bislang konnte jedoch keine direkte Bindung zwischen Wildtyp-p53 und VDR nachgewiesen werden. Allerdings führen „*gain of function*“ Mutation von p53 zu einer erhöhten Interaktion von mutp53 mit VDR. Dabei wird vermutet, dass mutp53 an den VDR/RXR Komplex bindet und so die Transkription der Targetgene beeinflusst. Die Bindung von mutp53 führt ebenso zu einer positiven transkriptionellen Regulation des Gens *VDR*. Unter anderem konnte auch eine Verminderung der Caspase-Aktivität beobachtet werden, nachdem die

Zellen mit Cisplatin oder Etoposid behandelt wurden. Der Effekt der Abnahme der Apoptoserate konnte ausschließlich in Zellen mit Mutationen in p53 nachgewiesen werden [127,286]. Ebenfalls in der Literatur beschrieben ist, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 bzw. AP-2 α mit p53 interagieren kann und dadurch die transkriptionelle Aktivierung von Targetgenen reguliert [287,288].

Aufgrund der vorausgegangenen Interaktionsstudien von p53 wurde folgendes Model (Abbildung 53) für die transkriptionelle Aktivierung von *ALOX5* entwickelt:

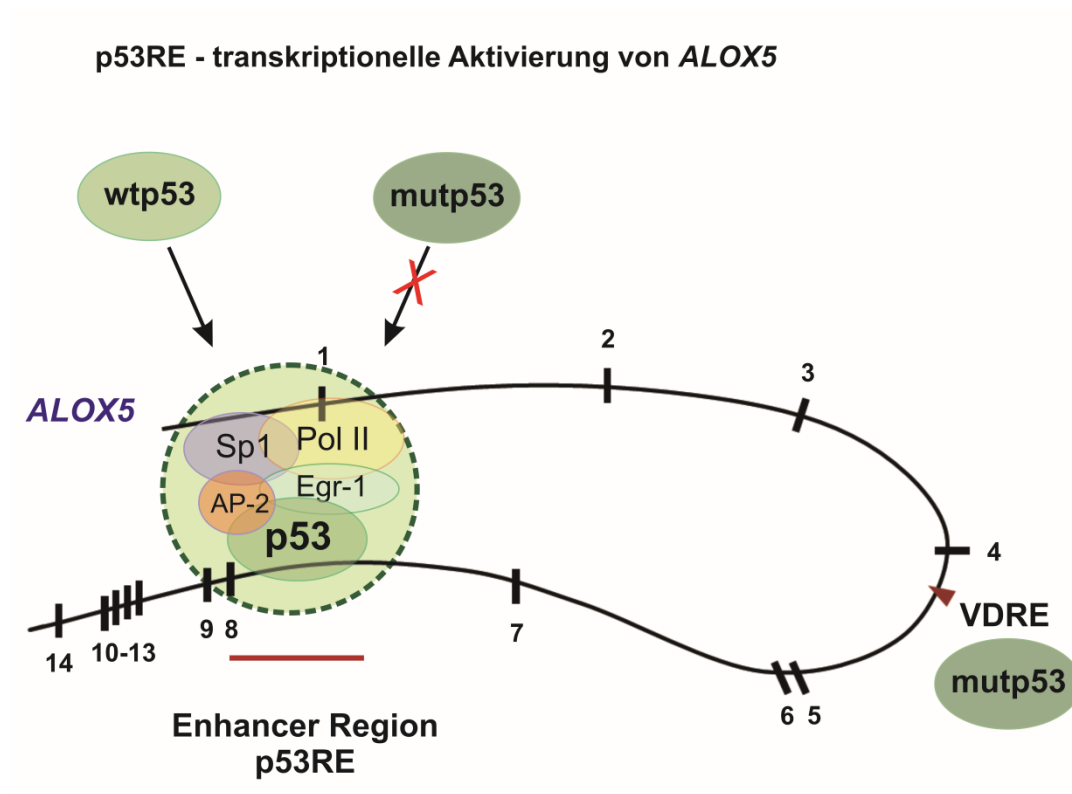


Abbildung 53. „Loop-Hypothese“ der *ALOX5*-Expression.

Dargestellt sind mögliche Transkriptionsfaktoren, die bei der Expression von *ALOX5* eine entscheidende Rolle spielen könnten. Das Model basiert auf vorangegangenen Interaktionsstudien zwischen p53 und anderen Transkriptions-faktoren wie Sp1, Egr.1 und AP-2.

Nachfolgende Experimente sollten mögliche weitere Interaktionspartner die an der Transkriptionsmaschinerie der *ALOX5*-Expression beteiligt sind, genauer untersuchen. Dabei war von Interesse, ob und welche Transkriptionsfaktoren zusätzlich zu p53 an der Enhancer-Sequenz binden können. Der dafür verwendete Oligonukleotid-Assay basiert auf einem Protein-Pull-Down, bei dem die Faktoren mittels Streptavidin-Biotin-Konjugation

aus Ganzzelextrakten herausgezogen werden. Durch die Behandlung mit Act.D konnte eine sehr schwache Bindung von p53 an die CpG reiche Sp1 Binderegion detektiert werden (Abbildung 19) [202]. Dies könnte dafür sprechen, dass p53 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 im Promotorbereich interagieren kann. Da das Assaysystem leider keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferte, sollte in weiterführenden Experimenten, wie ChIP-Seq, ChIP oder Co-IP die Fragestellung weiter untersucht werden.

4.2.3 Regulation der zellulären 5-LO Expression in Abhängigkeit von wtp53

Um die p53-abhängige Expression der 5-LO zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die humanen Zelllinien U2OS, MCF7 und HCT116 mit endogener p53-Expression verwendet. Ebenso wurden Zelllinien untersucht die kein oder ein mutiertes p53 Protein exprimieren. Die negativen Zelllinien die dabei verwendet wurden, zeigten jeweils Mutationen in der DNA-Binderegion, wodurch es zu einem Verlust der Funktionalität „*loss of function*“ des p53 Proteins kommt [122,123]. Diese Region ist besonders wichtig, da sie für das Binden des Proteins an die DNA erforderlich ist [76]. Durch diese p53-negativen Zelllinien sowie durch eine Reihe von p53 Knockdown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Regulation der 5-LO-Expression in direkter Abhängigkeit zum p53-Wildtyp-Status der Zelle steht. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den von Catalano *et al.* 2004 veröffentlichten Arbeiten, in denen eine p53-unabhängige 5-LO-Expression beschrieben wurde [246].

Um die Abhängigkeit im Detail zu charakterisieren, wurden zeitabhängige Expressionsanalysen der 5-LO in U2OS-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen war es möglich zu zeigen, dass die Expression in unbehandelten Zellen nahezu unverändert blieb, wohingegen die Expression nach 48 Stunden Act.D oder Eto Behandlung stark zunahm (Abbildung 21 und Abbildung 22). Diese Ergebnisse ließen sich auf RNA Ebene bestätigen, wobei hier die Levels der *ALOX5*-Transkripte schon nach 24 Stunden anstiegen (Abbildung 20). Beide Stimuli führten zu einer zeitversetzten Aktivierung und Akkumulierung von p53 im Nukleus und einer nachgeschalteten Induktion der 5-LO-Expression. Diese Daten bestätigen Beobachtungen aus bereits vorangegangenen Studien, dass die 5-LO-Expression nach genotoxischem Stress zeitabhängig ansteigt [245][246]. Im Widerspruch zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen ist die für diese Arbeit ermittelte Expression p53-abhängig. Um den Grad der Aktivierung des *ALOX5*-Gens mit bekannten p53 regulierten Targetgenen zu vergleichen, wurden Expressionsanalysen

in den humanen Zelllinien U2OS, MCF7 und HCT116 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen, wie beschrieben, mit beiden Zytostatika behandelt und auf ihr Expressionsverhalten hin untersucht. In allen drei Zelllinien konnte eine Zunahme von *ALOX5*-Transkripten detektiert werden. Auch die Induktion bekannter Targetgene, wie *CDKN1A* (p21), *BAX*, *MDM2* oder *PUMA* (Abbildung 23) [190] konnte nachvollzogen werden. Der direkte Vergleich zeigte vergleichbare Zunahmen der Transkriptmengen von *ALOX5* und bekannten p53 Targetgenen.

Die Bedeutung von funktionsfähigem p53 mit wt-Status untermauern Expressionanalysen mit p53-negativen Zellen. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte eine Steigerung der *ALOX5*-Transkripte beobachtet werden (Abbildung 26). Auch die erhobenen Daten zu shRNA Knockdown-Versuchen von p53 bestätigen die Vermutung einer p53-abhängigen transkriptionellen Regulation der 5-LO. Sowohl in U2OS-Zellen als auch in MCF7-Zellen führte der p53-Knockdown zu einer signifikanten Abnahme der *ALOX5*-Transkriptmengen (Abbildung 27). Auch der direkte Vergleich zwischen den Zelllinien HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-} bestätigte die zuvor erworbenen Ergebnisse. Hierbei zeigte die Expressionsanalyse von HCT116p53^{+/+} eine signifikante Induktion des *ALOX5*-Gens sowohl nach Act.D (**p < 0,001) als auch nach Eto (**p < 0,01) Behandlung. Dagegen konnte keine transkriptionelle Regulation bzw. Veränderung der Transkription in HCT116p53^{-/-} detektiert werden (Abbildung 24). Der Vergleich der basalen 5-LO-Expression verdeutlicht zusätzlich das Ergebnis (Tabelle 41).

Tabelle 41: Vergleich der basalen 5-LO-Expression (2^{-ΔCt}-Werte) s. Abbildung 24.

p53-Status	w/o	Act.D	Eto
HCTp53 ^{+/+}	0,026	0,436	0,266
HCT116p53 ^{-/-}	0,001	0,001	0,001

Auch die Analyse auf Proteinebene zeigte ein ähnliches Ergebnis. Es war eine deutliche Zunahme der Proteinmenge mittels Western Blot-Analyse nachweisbar, jedoch ausschließlich für die Wildtyp-exprimierenden p53 Zelllinien. Der Vergleich mit dem p53-Targetgen *CDKN1A* (p21) verdeutlicht noch einmal die Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivierung von wtp53 (Abbildung 23). Die Knockdown Experimente in denen wtp-53 gezielt in U2OS- und MCF7-Zellen durch shRNA herunterreguliert wurde, lieferten einen weiteren Beweis einer abhängigen Regulation durch p53. Auch hier konnte

eine signifikante Reduktion der Induktion von *ALOX5* sowie den p53-regulierten Targetgenen *CDKN1A* und *BAX* nachgewiesen werden (Abbildung 28 und Abbildung 29).

4.2.4 Möglicher Einfluss von mutp53 auf die 5-LO-Regulation

Da in mehr als 50% aller soliden Tumoren p53 mutiert exprimiert wird [122] stellt sich nun die Frage, warum es dennoch zur Überexpression von 5-LO und COX-2 kommen kann. Gegenstand einer Vielzahl aktueller Studien ist die transkriptionelle Regulation durch mutp53 über „gain of function“ Mutationen. Die durch Mutation neu gewonnenen Funktionen führen zu einer Dysregulation vielzähliger p53-regulierter Targetgene. Durch die Expressionsänderungen werden verstärkt Targetgene reguliert die zu erhöhter Proliferation, Resistenz gegen Apoptose und Chemotherapeutika, stärkerer Invasivität oder Metastasierung führen können. Gegenwärtige Forschungsarbeiten beschäftigen sich intensiv mit den molekularen und regulatorischen Grundlagen der p53-GOF. Neben der direkten Bindung an die Promotorregionen und Rekrutierung von Ko-Aktivatoren oder Repressoren kann mutp53 mit diversen anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und die transkriptionelle Regulation dadurch beeinflussen. Interessanterweise wurden hierbei Interaktionspartner identifiziert, die auch bei der Regulation der 5-LO eine zentrale Rolle spielen. Dazu zählen, unter anderem, die Transkriptionsfaktoren Sp1, Vitamin D3-Rezeptor (VDR), NF- κ B und NF- κ B, die nach spezifischen Stimuli wie Calcitriol- oder TNF- α -Behandlung von mutp53 gebunden werden. Interessanterweise konnte in bereits vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass mutp53 zu einer gesteigerten Aktivität des Faktors NF- κ B führt [167]. Die veränderte Targetgenexpression durch mutp53 induziert eine erhöhte Apoptoseresistenz gegenüber Vitamin D- (VDR) oder TNF- α -Behandlung (NF- κ B) [123,289].

In Tabelle 42 sind verschiedene Gene zusammengefasst, auf die mutp53 einen Einfluss bei der Transkription nimmt. Dabei werden Gene wie *MDR1* (ABC-Transporter) oder *EGR1* (Transkriptionsfaktor) reguliert, die zu einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika beitragen. Ebenso verstärkt mutp53 die Expression der Gene *MYC* und *EGF1R* die Proliferation der Zellen [290]. Ein weiteres Beispiel für die transkriptionelle Regulation durch mutp53 ist die Expression von *ALOX15*. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ALOX15* signifikant durch mutp53 hochreguliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte eine transkriptionelle Änderung durch wtp53 detektiert werden [123].

Tabelle 42: „gain of function“ Mutationen von p53 [290].

Gene die durch eine „GOF“ Mutation hochreguliert werden	Mutation	Referenz
<i>ALOX15-15-Lipoxygenase</i>	p53-His ¹⁷⁵	[123]
<i>MDR1-“Multi drug resistance gene 1“</i>	p53-Ala ¹⁴³ , p53-His ¹⁷⁵ , p53-Trp ²⁴⁸ , p53-Ser ²⁴⁹ , p53-His ²⁷³ , p53-Gly ²⁸¹	[129,291–293]
<i>EGR1-“Early growth response 1“</i>	p53-Ala ¹⁴³ , p53-His ¹⁷⁵ , p53-Trp ²⁴⁸ , p53-His ²⁷³ , p53-Gly ²⁸¹	[292–294]
<i>IGF-1R-“Insulin-like growth factor I receptor“</i>	p53-Ala ¹⁴³ , p53-Trp ²⁴⁸ , p53-His ²⁷³	[295]
<i>VEGF-“Vascular endothelial growth factor“</i>	p53-His ¹⁷⁵	[296]
<i>Interleukin-6</i>	p53-Val ¹³⁵ , p53-Phe ¹³²	[297]
<i>MYC</i>	p53-Ala ¹⁴³ , p53-His ¹⁷⁵ , p53-Trp ²⁴⁸ , p53-His ²⁷³ , p53-Gly ²⁸¹	[129]

4.2.5 5-LO Aktivität – Induktion der Leukotrienbiosynthese durch p53

Für die Bestimmung der Enzymaktivität in intakten Zellen waren keine 5-LO-Metabolite detektierbar. Somit wurden zur Charakterisierung der 5-LO-Aktivität die mit den jeweiligen Zytostatika behandelten Zellen homogenisiert. Nach Zugabe exogener AA und zehnminütiger Inkubation konnten die beiden Hauptmetabolite 5-HETE und LTB₄ durch LC-MS/MS nachgewiesen werden. Die Experimente ergaben eine signifikante Zunahme von 5-HETE und LTB₄ nach Behandlung mit Act.D bzw. Eto (Abbildung 30). Die zelluläre Aktivität der 5-LO ist von mehreren Faktoren abhängig. Sie wird, u.a. durch den Redoxstatus der Zelle, die Expression von FLAP, verschiedenen Phosphorylierungen (inhibitorische sowie aktivierende) und durch die Anwesenheit von Calcium beeinflusst [134–136,298]. All dies konnte dazu führen, dass die Aktivität der 5-LO in den intakten Zellen nicht nachweisbar war. Durch das Zerstören der Zellintegrität konnten diese Einflussfaktoren weitestgehend umgangen werden. Die exogene Zugabe von Calcium und ATP ermöglichten die Aktivierung der 5-LO auch in Zellhomogenaten. Die gesteigerte Enzymaktivität in den behandelten Zellen ist somit auf eine erhöhte Expression der 5-LO im Vergleich zur Kontrolle zurückzuführen. Zusätzlich konnte die Aktivität der 12-LO und 15-LO erfasst werden. Auch hier ist eine deutliche Induktion der Produkte 12-HETE und

15(S)-HETE zu sehen (Abbildung 31). Sowohl für die 12-LO als auch für die 15-LO konnte bereits eine erhöhte Induktion in Tumorzellen beschrieben werden [299,300]. Des Weiteren konnten Studien von Zhao *et al.* belegen, dass die humane 5-LO sowie der Metabolit LTB₄ zu einer erhöhten Expression von NF-κB in Leberzellkarzinom-Zellen führen [163]. Ebenso bewirkt LTB₄ die Degranulierung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die ebenso einen positiven Effekt auf die Aktivierung von NF-κB sowie p53 (wt) ausüben [140–142,247]. Die durch den oxidativen Stress verursachte Aktivierung des p53-Signalwegs könnte zusätzlich die transkriptionelle Regulierung der Targetgene 5-LO und COX-2 bewirken (siehe Hypothese, Abbildung 55 und Abbildung 56).

4.2.6 p53 als posttranskriptioneller Regulator der 5-LO und COX-2

Interessanterweise ist neben der 5-LO auch die COX-2 ein direktes Targetgen von p53 [301]. Die COX-2, auch als Prostaglandinsynthase-2 (PGHS-2) bezeichnet, ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese. Dabei wird Arachidonsäure zu Prostaglandinen (PG), Thromboxanen (TX) und Prostacyclinen (PG) umgesetzt. Prostaglandine, wie PGE₂, führen dazu, dass polymorph-kernige Leukozyten die Eicosanoidbiosynthese von pro-inflammatorisch auf antiinflammatorisch „umprogrammieren“ und einen Stopp infiltrierender neutrophiler Granulozyten initiieren [162,302].

Die COX-1 wird im Gegensatz zur COX-2 vermehrt konstitutiv exprimiert. COX-2 wird verstärkt während Entzündungsvorgängen induziert. [303]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der COX-2 direkt durch den Transkriptionsfaktor p53 reguliert werden kann [301]. Dabei handelt es sich um ein „downstream“ reguliertes Targetgen, welches über den Ras/Raf/MAPK Signalweg aktiviert wird. Aus zuvor veröffentlichten Studien geht hervor, dass die COX-2 ebenso einen Einfluss auf p53 ausüben kann, indem es nach genotoxischem Stress die Induktion der Apoptose inhibiert. Des Weiteren konnte eine direkte Bindung zwischen p53 und COX-2 bestätigt werden [304].

Auffällig bei den verschiedenen Studien war vergleichbare Expression von 5-LO und COX-2, die in einer Vielzahl von malignen Tumoren erhöht ist [154,155,305]. Die Regulation des Enzyms erfolgt vorwiegend durch Wachstumsfaktoren sowie durch Mediatoren wie TNF-α, Interleukin-1β oder Lipopolysaccharide [306,307]. Des Weiteren scheint NF-κB ein weiterer wichtiger Faktor bei der transkriptionellen Regulation des

PTGS2-Gens zu sein [308]. Zur Hemmung der COX-2 dienen sog. NSAIDs, die zur Behandlung chronischer Entzündungen wie rheumatoide Arthritis angewendet werden [309]. Mausmodelle in denen das *PTGS2*-Gens durch eine Deletion inaktiviert wurde und dadurch ein „*loss of function*“ COX-2-Protein exprimieren, zeigten neben der Hemmung einer Entzündungsreaktion auch eine Hemmung der Tumorgenese [155]. Ebenso konnte eine Hochregulierung der COX-2 durch TNF- α , IL-1 β , IL-2, TGF- β oder der Onkogene *RAS* und *SRC* beobachtet werden [165,310], die in verschiedenen Tumorentitäten wie Prostatakarzinom [311], Lungenkarzinomzellen [310], Kolonkarzinom [312], Blasenkarzinom [305] oder Mammakarzinom [313] nachgewiesen wurden.

In dieser Arbeit konnten interessante regulatorische Ähnlichkeiten von COX-2 und 5-LO beobachtet werden. Sowohl die Expression der COX-2 als auch die Expression der 5-LO werden transkriptionell durch wtp53 reguliert. Ebenso konnten erhöhte Spiegel von LTB₄ und PGE₂ nach genotoxischen Stress in Tumorzellen gemessen werden. Auch eine Bindung zwischen 5-LO und p53 konnte mittels Interaktionsstudien charakterisiert werden. Vermutlich bewirkt die Bindung, ähnlich wie bei der COX-2, eine Reprimierung proapoptotischer p53-regulierter Targetgene.

4.3 Biologische Relevanz der transkriptionellen Regulation der 5-LO durch p53

4.3.1 Kolokalisation der Proteine p53 und 5-LO

Zur näheren Charakterisierung der biologischen Bedeutung der Regulation der 5-LO durch p53 wurden verschiedenen *in vitro* Versuche durchgeführt. Lokalisationsstudien in Kombination mit Immunfluoreszenzaufnahmen dienten dazu, die Lokalisation von p53 und 5-LO in der Zelle näher zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die 5-LO in unstimulierten Zellen sowohl im Zytosol (z.B. Neutrophile, Eosinophile und Monozyten) als auch im Nukleus (z.B. alveolare Makrophagen oder Mastzellen) nachweisbar ist [314]. Nach Zellstimulation durch, z.B. Entzündungsmediatoren oder einem Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels kommt es zur Translokation der 5-LO an die nukleäre Membran und zur Kolokalisation mit dem 5-LO-aktivierenden Protein (FLAP) sowie der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) [315,316]. Um die Lokalisation der 5-LO im Zusammenhang mit p53 genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen sowohl mit Act.D als auch Eto behandelt und anschließend analysiert. Nachdem die Zellen für 48 Stunden

mit den Zytostatika behandelt wurden, erfolgte die Auftrennung der Zellkompartimente in die zytosolische und membranäre Fraktion mittels Lokalisationsassay. Beide Fraktionen wurden anschließend bezüglich ihrer Expression mittels Western Blot analysiert. Durch beide Behandlungen kam es, wie erwartet, zu einer autoregulatorischen Aktivierung der *TP53* Transkription und zur Akkumulierung von p53 im Nukleus [254].

Der aktivierte, funktionelle Transkriptionsfaktor p53 ist normalerweise im Zellkern lokalisiert. Jedoch in einigen Tumoren, wie beim Mammakarzinom, Neuroblastom, Kolonkarzinom und in malignen Melanomen ist p53 überwiegend im Zytosol zu finden [254]. Die Daten des Lokalisationsassays zeigten, dass die Menge an p53 sowohl in der membranären als auch in der zytosolischen Fraktion nach beiden Behandlungen deutlich zunahm. Auch die 5-LO konnte in beiden untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. Wobei in der zytosolischen Fraktion nur eine geringe Proteinkonzentration der 5-LO gefunden wurde (Abbildung 34). Dies ist vermutlich auf die Translokation des Enzyms an die Kernmembran zurückzuführen [316]. Die Western Blot-Analyse aller Fraktionen ließ keine eindeutigen Aussagen zur Lokalisation beide Proteine zu. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Diese Methode eignet sich besonders zur Charakterisierung intrazellulärer Protein-Lokalisationen sowie -Interaktionen.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Act.D- bzw. Eto-stimulierten U2OS-Zellen wiesen eine charakteristische, diffuse Akkumulierung von p53 im Nukleus auf. Zudem wurde die 5-LO untersucht, welche ebenfalls um den bzw. in dem Zellkern akkumulierte. Durch die Überlagerung der Fluorochrome beider detektierten Proteine, konnte eine partielle Kolokalisation im Nukleus nachgewiesen werden (Abbildung 35 und Abbildung 36). Um mögliche unspezifische Färbungen auszuschließen, wurden die Experimente mit jeweils drei verschiedenen Antikörpern, unterschiedlicher Spezies, durchgeführt. Alle Messungen führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

Zur genaueren Charakterisierung der Kolokalisation wurden optische Serienschritte (Z-Stapel), bei einer Tiefenschärfe von 0.25 μm durch den Zellkern, aufgenommen. Dabei konnte eine signifikante Überlagerung der Proteine ermittelt werden. Bei der Betrachtung der Zellkernkompartimente fiel auf, dass eine erhöhte Menge an p53 und 5-LO um die sich im Kern befindenden Kernkörperchen (Nukleoli) akkumulieren (Abbildung 36). Im Nukleolus werden die ribosomalen Untereinheiten synthetisiert und zusammengesetzt. Eines der Hauptproteine des Nukleolus ist das Protein Nukleolin [317]. Durch eine Dreifachfärbung der Proteine p53, 5-LO und Nukleolin (anti-Nukleolin-Antikörper) könnte

die Lokalisation mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden. Allerdings könnte es sich bei den Kompartimenten auch um PML-nuclear bodies (PML-NBs) handeln. Diese Strukturen stellen dynamische Multiproteinkomplexe dar [318,319]. Catalano *et al.* konnte bereits 2004 zeigen, dass die Überexpression der 5-LO zu einer Inhibierung der Bindung von p53 und PML führt. Dies hat zur Folge, dass eine Rekrutierung von p53 in die PML-NBs unterbleibt und die natürliche Aktivierung pro-apoptotischer Targetgene, wie z.B. BAX [245].

Die für die Arbeit aufgenommenen Zellkompartimente unterscheiden sich allerdings deutlich von der Größe der PML-NBs. Die sichtbaren Strukturen zeigen vermutlich Nukleoli, welche sich mit einer Größe von bis zu 3 µm von PML-NBs abheben [317].

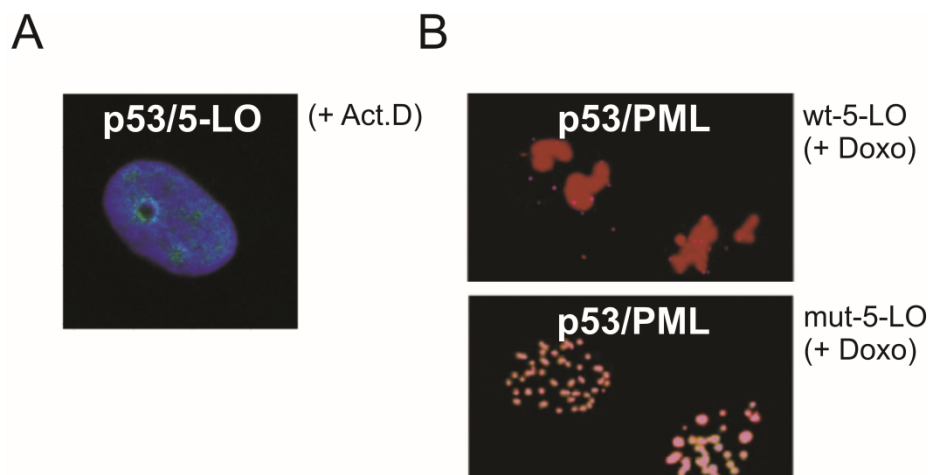


Abbildung 54. Vergleich der Konfokalmikroskopiebilder (modifiziert nach Catalano *et al.* [246])

(A) Stimulierte U2OS mit 5 nM Act.D (48 h). Akkumulierung von p53 und 5-LO um die sich im Kern befindenden Kernkörperchen (Nukleoli). (B) Transfizierte A549-Zellen (wt-5-LO und mut-5-LO); Behandelt mit 250 ng/ml Doxorubicin für 12 h. Proteinfärbung mittels anti-p53 DO-1 mAb und anti-PML mAb (modifiziert nach Catalano *et al.* [246]).

4.3.2 Bindung der humanen 5-Lipoxygenase an den Transkriptionsfaktor p53

Die mittels Konfokalmikroskopie in dieser Arbeit erstmalig gezeigte direkte Interaktion von p53 und 5-LO konnte nachfolgend durch Co-Immunpräzipitationen bestätigt werden. Die Experimente wurden mit überexprimierter und rekombinanter 5-LO durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Western Blot. Für die Überexpression wurden U2OS-Zellen mit einem Wildtyp-exprimierenden-5-LO Plasmid transient transfiziert und

anschließend mit Act.D und Eto behandelt. Die Inkubation der rekombinaten 5-LO mit p53 erfolgte mit Ganzzellextrakten aus HEK293T-Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl überexprimierte als auch rekombinante 5-LO eine Bindung mit dem Transkriptionsfaktor p53 eingehen kann. Eine spezifische Bindung der Proteine an die mitgeführten Kontrollen konnte nicht detektiert werden (Abbildung 37 und Abbildung 38). Ähnliche Interaktionsstudien wurden bereits für die COX-2 und p53 durchgeführt. In Zellen, in denen COX-2 überexprimiert vorlag, konnte eine Bindung an den Transkriptionsfaktor p53 nachgewiesen werden. Diese Bindung führte zu einer Inhibition der p53 Funktionen, wodurch die Induktion von Apoptose nach DNA-Schäden blockiert wurde [304]. Durch die Inkubation mit einem COX-2 Inhibitor (NS-298) konnte die Interaktion wieder aufgehoben werden [304,309,301]. Eine ähnliche Rolle könnte die 5-LO in der Entstehung der Tumorgenese spielen. In einer Vielzahl von Tumorzelllinien wurde bereits ein vergleichbarer anti-apoptotischer Effekt für die 5-LO beschrieben. Überexprimierte 5-LO und die entsprechenden Metabolite, führten zu einer verstärkten Inhibition der Apoptose und induzierten eine Proliferation der Zellen [320,258,137].

4.3.3 Effekt der 5-LO Überexpression auf die Expression p53-regulierter Targetgene

In dieser Arbeit konnte in mehreren Experimenten gezeigt werden, dass die 5-LO in Folge von genotoxischem Stress verstärkt durch p53 exprimiert und vornehmlich im Zellkern akkumuliert wird. Der Zusammenhang von 5-LO-Überexpression und einer gesteigerten Proliferationsrate von Tumorgewebe wird in der Literatur zunehmend diskutiert [258,152,259]. Aufgrund dessen wurden Expressionsstudien zu p53-regulierten Targetgenen in 5-LO- überexprimierenden U2OS- und HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die U2OS- und HeLa-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen nach der Transfektion jeweils mit 5 nM Act.D oder mit 10 µM Eto für 48 Stunden behandelt. Die Änderungen der Transkriptmenge von *ALOX5* sowie der p53-regulierten Targetgene wurde mittels RT-qPCR charakterisiert.

Bei der Analyse der Expression konnte festgestellt werden, dass HeLa-Zellen keine Veränderungen in der Expression nach der Transfektion mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-5LO aufwiesen (Abbildung 43). 5-LO-überexprimierende-U2OS-Zellen zeigten dagegen einen deutlichen Anstieg in der Transkriptmenge der p53-regulierten Targetgene

CDKN1A und *DDB2* (*Damaged DNA binding Protein 2*). Nach den Behandlungen stieg die Transkriptmenge von *CDKN1A* um $\Delta 36,6\%$ (Act.D) bzw. $\Delta 59,2\%$ (Eto) an. Vergleichbare Ergebnisse konnten für das Gen *DDB2* ermittelt werden, bei dem die Expression um $\Delta 37,7\%$ (Act.D) und $\Delta 50,8\%$ (Eto) zunahm (Abbildung 40). Die Expression von *CDKN1A* wird hauptsächlich in Folge von DNA-Schädigungen durch p53 erhöht. Dadurch kommt es zur Inhibierung von CDK2 durch p21^{waf1/cip1} und in Folge dessen zur Unterbrechung des Zellzyklus. Dies ermöglicht zum einen die Reparatur der DNA und verhindert zum anderen die p53-induzierte Apoptose. Des Weiteren inhibiert p21^{waf1/cip1} die MAPK vermittelte Apoptose sowie die p53-unabhängige Apoptose durch die Caspase-3, -8 und -10 [321]. *DDB2* selbst, ist ein heterodimerer Komplex, der in der Lage ist ein breites Spektrum von DNA-Schäden zu erkennen und diese für DNA-Reparaturproteine zu markieren [322]. Zudem wurden die pro-apoptotischen Gene *BAX*, *PUMA* und *PAG* untersucht. Diese zeigten nach der Behandlung mit Act.D und Eto keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich ihrer Expression verglichen mit den Kontrollzellen.

4.3.4 Einfluss von überexprimiertem Wildtyp-p53 sowie überexprimierter 5-LO auf die 5-LO-Promotor/Enhancer-Aktivität

Wie bereits erwähnt (siehe 4.2.1) konnte durch Reporteranalysen mit einem 5-LO-Promotor/p53-RE-Konstrukt nachgewiesen werden, dass Wildtyp-p53 die Expression von *ALOX5* steigern kann. In weiterführenden Experimenten wurde neben Wildtyp-p53 auch die 5-LO überexprimiert. Dies führte zur Suppression der 5-LO-Promotoraktivität. Wurden diese Experimente mit einem BAX-Luc-Konstrukt anstatt des beschriebenen 5-LO-Konstruktes durchgeführt, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die Überexpression von Wildtyp-p53 führte zur gesteigerten BAX-Promotoraktivität. Durch die Kotransfektion der 5-LO konnte dieser Effekt signifikant reprimiert werden (Abbildung 46, ***p < 0,001). Ein ähnliches Ergebnis zeigte Catalano *et al.* in seinen 2004 veröffentlichten Studien. Wildtyp-5-LO-überexprimierte Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der BAX-Promotoraktivität. Wurden die Zellen dagegen mit einem Konstrukt transfiziert, welches eine mut-5-LO überexprimierte, blieb die BAX-Promotoraktivität unverändert, verglichen mit der Kontrolle [245][246]. Interessanterweise konnten diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Bei der Transfektion der Zellen mit verschiedenen 5-LO-Mutanten konnte eine signifikante Abnahme sowohl für die 5-LO- als auch für die BAX-Promotoraktivität

nachgewiesen werden (Abbildung A10). Dieser Effekt könnte auf die Bindung der 5-LO mit p53 und dem daraus resultierenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor zurückzuführen sein. Vermutlich führte die von Catalano *et al.* verwendete 5-LO-Mutante (C6-Deletion) zu einem Bindungsverlust der Proteine 5-LO und p53 [245]. Dies könnte erklären, warum die 5-LO-Mutante keinen supprimierenden Einfluss auf die BAX-Promotoraktivität ausübte.

Erstmalig lieferten diese Studien einen Hinweis auf eine negative Autoregulation der 5-LO durch die Interaktion mit p53. Ähnliche Wechselwirkungen wurden bereits für das Gen *MDM2* beschrieben. Das *MDM2*-Gen ist ein Targetgen von p53 und wird von diesem transkriptionell reguliert. Die Komplexbildung des Mdm2-Proteins mit p53 führt zu einer Hemmung der Funktion des Transkriptionsfaktors und dessen Degradierung. In einer Vielzahl von Krebserkrankungen konnte eine Mdm2-Überexpression und ein gleichzeitiger Funktionsverlust von p53 nachgewiesen werden [323,324].

4.3.5 Inaktivierung der *ALOX5*-Expression durch gezielten 5-LO-Knockdown

Aufgrund beschriebener anti-proliferierender und pro-apoptotischer Effekte für 5-LO-Inhibitoren [137,152,259,325], wurde unter Verwendung von 5-LO-shRNA der resultierende Phänotyp in U2OS- und HCT116-Zellen untersucht. Dafür kamen verschiedenen Assaysysteme, wie AnnexinV/PI-Färbung (p53-abhängig), Caspase-3 (p53-unabhängig), Viabilitätsassays und Expressionsanalysen zum Einsatz. Unter der Verwendung der 5-LO-shRNA war es möglich eine deutliche Suppression des *ALOX5*-Gens in beiden untersuchten Zelllinien zu erzielen (Abbildung 45 und Abbildung 46). Nachdem die Knockdown-Effizienz mittels RT-qPCR bestätigt werden konnte, erfolgte die genotypische Charakterisierung p53-regulierter Targetgene. Dabei fiel auf, dass die Expression des p53-Gens *TP53*, ähnlich wie die Expression der 5-LO (*ALOX5*), stark supprimiert war (Abbildung 48). Diese Beobachtung könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sich um eine Beeinflussung der *TP53*-Expression, hervorgerufen durch den 5-LO-Knockdown, handeln oder zum anderen um einen „Off-target Effekt“ der shRNA. In den vergangenen Jahren haben verschiedene Studien gezeigt, dass sogenannte *Missmatche* oder *scrambled* siRNA bzw. shRNA, die keine Homologie zum menschlichen Genom aufwiesen, zu einem starken Effekt auf unspezifische mRNA-Expression führen können. Dieser Effekt wird als „Off-target-Effekt“ bezeichnet und kann je nach Zelltyp und Organismus unterschiedlich ausfallen [326]. Schon vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass es unter der Verwendung verschiedener siRNAs gegen das

Gen *MEN1* zu einer deutlichen Änderung der Transkriptmenge und dem Proteingehalt von p53 kommen konnte, obwohl keine Homologie zu p53 bestand [327]. Diese Effekte könnten darauf beruhen, dass die transkribierte shRNA als miRNA fungiert. Nach der Integration der shRNA in das Wirtsgenom kommt es zu einer Pol II oder Pol III abhängigen Transkription. Die Transkripte imitieren pri-microRNA (primary microRNA) und werden ähnlich zum Prozess der miRNA durch Drosha (RNase III) in pre-microRNA (precursor microRNA) prozessiert. Die Pre-microRNAs lagern sich zu einer charakteristischen Haarnadelstruktur (*hairpin*) zusammen und können darüber unvollständig komplementär an eine mRNA binden, wodurch es zur Inhibierung der Translation kommt [328-329]. Auch die erhöhte Suppression von p53 nach shRNA vermitteltem 5-LO-Knockdown, könnte auf die eben beschriebenen Effekte zurückzuführen sein. Die Suppression konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in verschiedenen Zellsystemen detektiert werden.

Catalano *et al.* hingegen, beschrieb bereits 2005, eine abhängige Regulation von p53 durch 5-LO. Transfizierte 5-LO^{-/-}-Mauszellen (MEFs, p21-Luc), zeigten dabei eine deutlich geringere Transaktivierung des p53-regulierten Targetgens p21 als die 5-LO^{+/+}-Zellen. Ebenso konnte durch die Inhibierung der 5-LO-Kaskade (mittels AA861) eine Verminderung der transkriptionellen Aktivierung von p53 beobachtet werden. Des Weiteren führte der Knockout der 5-LO zu einer starken Reduzierung der Phosphorylierung von p53 an Serin-15 [247]. Diese posttranslationale Modifikation an der Aminosäure Serin-15 ist ein wichtiger Marker für die Proteinstabilität, Lokalisation, DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von p53 [23,108,252]. Experimente in denen durch Mutation gezielt Serin-15 durch die AS Alanin ersetzt wurden (S15A), führen zu einer deutlichen Abnahme der p53-Expression [247]. Es bleibt zu klären, welche beeinträchtigenden Effekte die 5-LO auf den Transkriptionsfaktor p53 ausübt oder ob es sich bei den beschriebenen Beobachtungen tatsächlich um einen Off-target-Effekt handelt.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der 5-LO-Knockdown-Zellen konnte unter der Verwendung der 5-LO-shRNA zudem eine gesteigerte Apoptose detektiert werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen, zeigten die 5-LO-Knockdown-Zellen eine zusätzliche Steigerung der Apoptose sowohl in HCT116p53^{+/+} als auch in HCT116p53^{-/-}-Zellen nach den Behandlungen mit Act.D und Eto (Abbildung 51, AnnexinV/PI-Färbung). Diese Zunahme unterschied sich allerdings nicht signifikant zwischen HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation und Induktion der Apoptose p53-unabhängig ist. Leider lieferten die Experimente zur Überprüfung einer

p53-unabhängige Apoptose (Caspase-Assay) durch den 5-LO-Knockdown keine eindeutigen Ergebnisse (Abbildung A7, A8 und A9).

Aufgrund beschriebener proliferierender und anti-apoptotischer Eigenschaften überexprimierter 5-LO in diversen Tumoren, beschäftigten sich einer Vielzahl von Studien mit dem Einsatz von 5-LO-Inhibitoren in der Krebstherapie. Diese Arbeiten konnten tatsächlich anti-proliferierende Effekte für 5-LO-Inhibitoren in Tumorzellen zeigen [152,259,325]. Tsukada *et al.* beschrieb als erster einen anti-proliferierenden Effekt durch den Einsatz des 5-LO-Inhibitors AA-681 in einer humanen Leukämie-Zelllinie [159]. Zudem konnten durch die Verwendung von potenten Leukotrien-Biosynthesehemmer pro-apoptotische Effekte beobachtet werden [325,161,330,331,156].

Hypothese

Zu Abbildung 55: In p53 Wildtyp exprimierenden Zellen kommt es nach „Einwirken“ von genotoxischem Stress oder bei Entzündungen zu einer p53-vermittelten Aktivierung der pro-inflammatorischen Targetgene *ALOX5* und *PTGS2*. Die Expression der Proteine 5-LO und COX-2 induziert die enzymatische Lipidoxidation der Arachidonsäure, wodurch vermehrt Entzündungsmediatoren wie Leukotriene und Prostaglandine sezerniert werden. Die bei Entzündungsprozessen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) könnten wiederum die Akkumulation von p53 und nachgeschaltet die Aktivierung von 5-LO und COX-2 induzieren. Durch die dauerhaft hohen intrazellulären Spiegel von ROS kann es zu endogenen DNA-Schäden und damit verbundenen Mutationen kommen (z.B. Mutationen von p53). Nach Überexpression der Proteine 5-LO und COX-2 konnte eine Bindung an den Transkriptionsfaktor p53 beobachtet werden. Diese Interaktionen könnte zur Folge haben, dass die Expression pro-apoptotischer Targetgene, wie z.B. *BAX* vermehrt gehemmt werden (siehe Abbildung 44).

Wildtyp p53

genotoxischer Stress,
Act.D oder Eto.

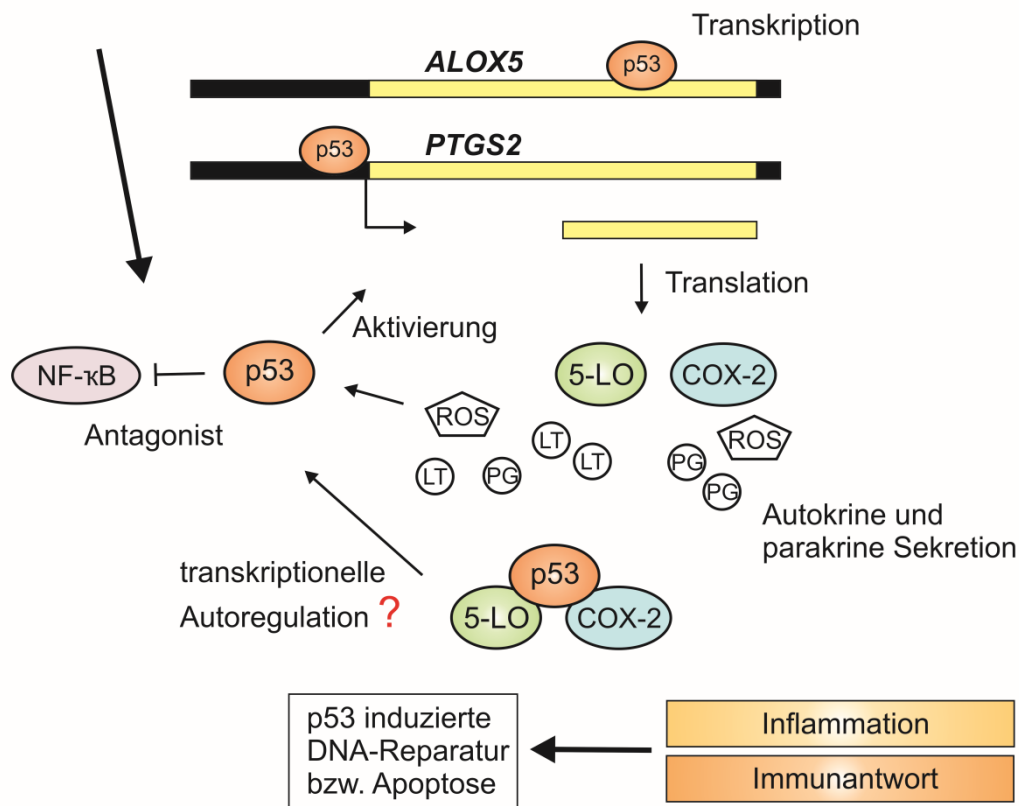


Abbildung 55. Induktion der Gene *ALOX5* und *PTGS2* durch den Transkriptionsfaktor p53.

COX-2 (Gen - *PTGS2*), 5-LO (Gen - *ALOX5*), LT - Leukotriene, PG-Prostaglandine, ROS-reaktive Sauerstoffspezies.

Zu Abbildung 56: Mutiertes p53 (GOF) stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Gene *ALOX5* und *PTGS2* zu aktivieren. Dies könnte durch die Bindung von mutp53 an den Transkriptionsfaktor NF-κB erfolgen. Dadurch kann zusätzlich die Aktivierung des Faktors gesteigert werden [167]. Auch in diesem Falle würde dies zur vermehrten Freisetzung von Leukotrienen und Prostaglandinen führen. Insbesondere LTB₄ und auch ROS könnten zu einer Aktivierung von NF-κB/mutp53 führen, wodurch tumorassoziierte Targetgene und pro-inflammatorische Enzyme wie 5-LO oder COX-2 permanent induziert werden [142,168]. In Tumorgeweben von Mäusen konnten bereits die Überexpression von 5-LO und COX-2 sowie ein erhöhter Arachidonsäure-Stoffwechsel nachgewiesen werden. Eine genauere Charakterisierung des NF-κB/mutp53 Signalwegs könnte bedeutende Hinweise für die Entstehung von Tumoren auf der Basis von chronischen Entzündungen liefern.

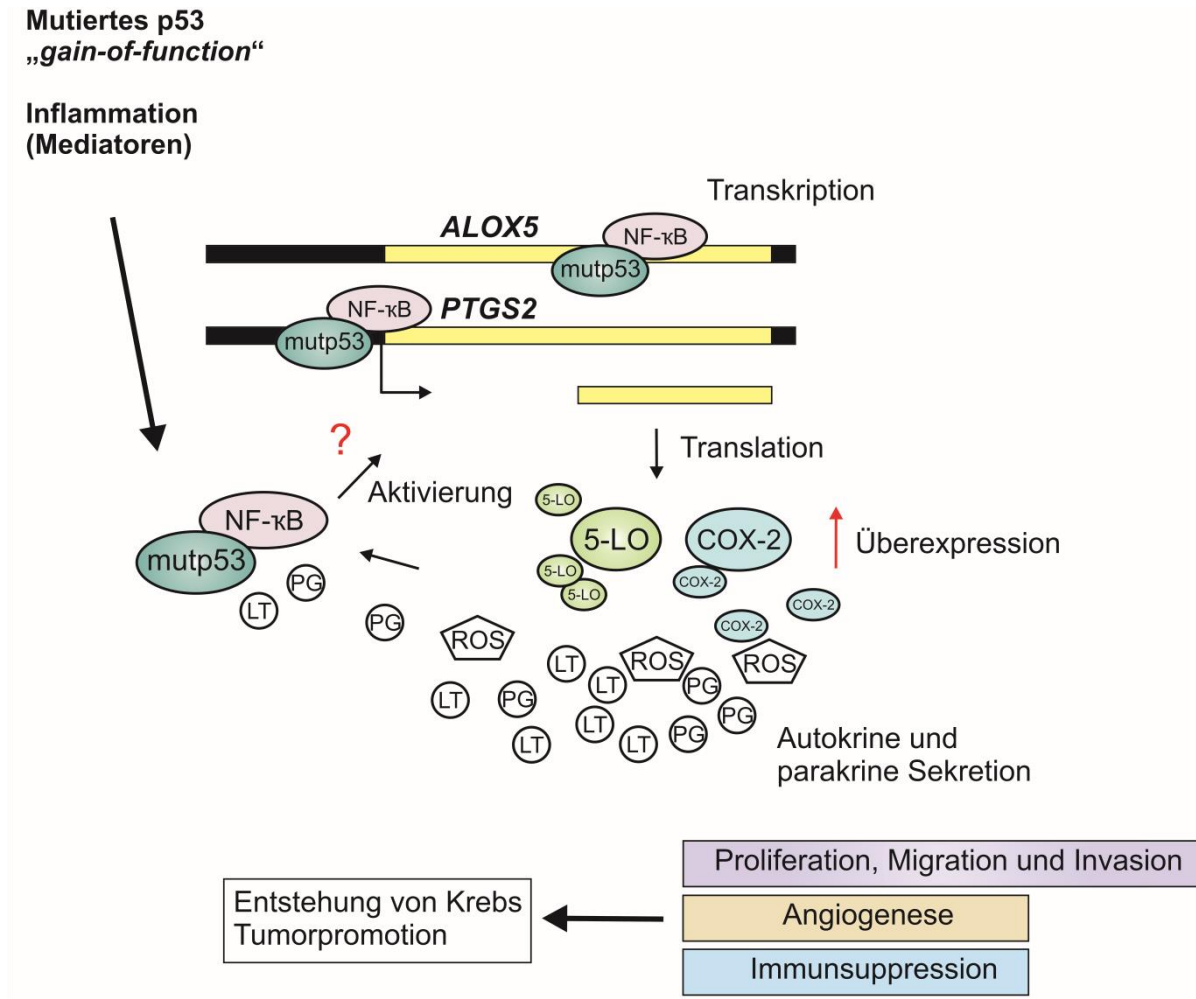


Abbildung 56. Mutp53 (GOF) als Aktivator der transkriptionellen Überexpression von *ALOX5* und *PTGS2*.

Mutp53 – Mutiertes p53 „gain-of-function“, COX-2 (Gen - *PTGS2*), 5-LO (Gen - *ALOX5*), LT-Leukotriene, PG-Prostaglandine, ROS-reaktive Sauerstoffspezies.

Zusammenfassung

Bei dem Tumorsuppressor p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle bei der Regulierung von zellulären Schadenssignalwegen einnimmt. Oxidativer Stress, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, Hypoxie, DNA-Schäden oder fehlerhafte Zellteilung führen zu einer Aktivierung und Akkumulation von p53. Dadurch werden Prozesse aktiviert, die Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Autophagie, Seneszenz oder Apoptose induzieren können. Aufgrund der Funktion zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelltod wird p53 auch als Wächter des Genoms bezeichnet. Angeborene oder spontan auftretende Mutationen des Gens *TP53* haben verheerende Auswirkungen auf die Genregulation. Zu den häufigsten genetischen Aberrationen gehören Punktmutationen, die zu einer fehlerhaften Expression des Proteins führen. Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass mehr als 55% aller Krebszellen eine Veränderung in einem der beiden Allele des *TP53*-Gens aufweisen. Dies kann zum einen zu einem vollständigen Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors führen („*loss of function* - *LOF*“) und zum anderen einen Funktionszugewinn („*gain of function* - *GOF*“) des p53-Proteins bedeuten. Dabei führen GOF-Mutationen zu veränderten p53-Proteinen mit neuen onkogenen Eigenschaften.

Der Defekt bzw. die Dysregulation der Signalwege ist durch den Verlust der Zellzykluskontrolle sowie der Induktion des programmierten Zelltodes charakterisiert. Dadurch sind die Zellen einer unkontrollierten Proliferation ausgesetzt und deren Tumorgenese wird gesteigert. Chronische Entzündungen sowie Infektionen zählen ebenso zu den möglichen Vorstufen von Tumoren. Erhöhte Expression pro-inflammatorischer Gene sowie die Sezernierung hochwirksamer Lipidmediatoren spielen dabei eine entscheidende Rolle. Infolge von intrazellulären sowie extrazellulären Stresseinwirkungen erfolgt eine Aktivierung und Akkumulation von p53 im Nukleus, wo er als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor an hochkonservierte Konsensussequenzen der Targetgene bindet und diese reguliert. Auf transkriptioneller Ebene ist p53 in der Lage als Aktivator oder als Repressor zu fungieren. In den durchgeführten Experimenten wurden als p53-Aktivatoren die klassischen Zytostatika Actinomycin D (Act.D) und Etoposid (Eto) eingesetzt. Die Behandlung mit Act.D führte selektiv in wtp53-exprimierenden Zellen zu einem G₁-Arrest, wohingegen Eto einen G₂-Arrest induzierte.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals durch eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung, die direkte Bindung von p53 an das Targetgen *ALOX5* beschrieben werden. *ALOX5* kodiert für die humane 5-Lipoxygenase, welches ein wichtiges Schlüsselenzym der Leukotrien-Biosynthese darstellt. Das Enzym katalysiert, mit Hilfe von FLAP, eine zweistufige Redoxreaktion der Arachidonsäure (AA) zu LTA₄. Aus dem Vorläufermolekül LTA₄ erfolgt wiederum die Umsetzung zu den pro-inflammatorischen Leukotrienen.

Das *ALOX5*-Gen befindet sich auf Chromosom 10q11.21 und besteht aus 14 Exons separiert durch 13 Introns. Die charakterisierte Bindungsregion von p53 befindet sich nicht im Promotorbereich sondern *downstream*, in der nicht-kodierenden Intron-G-Sequenz (Intron 7). Innerhalb dieser Sequenz konnte ein vorständig konserviertes p53-Bindemotiv identifiziert werden. Diese besteht aus vier Kopien einer palindromischen Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3'. Durch ChIP Experimente konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors bestätigt werden. Mittels Reporteragen Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Bindungsmotiv um einen Enhancer-Bereich handelt, der die transkriptionelle Expression des Gens verstärkt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass p53 ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Regulierung der 5-LO ist.

In weiterführenden Experimenten wurde die 5-LO-Expression in Abhängigkeit vom p53-Wildtyp Status analysiert. Dazu wurden verschiedene p53 exprimierende Zelllinien untersucht (wtp53, mutp53 und p53-null Zelllinien). Die Daten ergaben, dass 5-LO ausschließlich in Zellen mit wtp53-Status exprimiert wurde. Zelllinien mit einer p53-Mutation und dem damit verbundenem Verlust der DNA-Bindung (*LOF*), zeigten keine transkriptionelle Regulation der 5-LO. Der endgültige Beweis einer p53-vermittelten, transkriptionellen Regulierung erfolgte anhand von Knockdown Studien. In diesen Zellen wurde p53 gezielt durch shRNA herunterreguliert. Wiesen die Zellen zuvor eine deutliche und signifikante Induktion der 5-LO auf, konnte nach dem p53-Knockdown nur noch eine verminderte Expression nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisation von p53 und 5-LO untersucht. Dabei konnte in Act.D bzw. Eto stimulierten U2OS-Zellen beobachtet werden, dass 5-LO und p53 zeitgleich im Nukleus lokalisieren. Aufnahmen von optischen Serienschnitten der überlagerten Bereiche, bestätigten eine signifikante Kongruenz nach beiden Behandlungen. Aufgrund der beobachteten Kolo-kalisation, wurden infolgedessen Interaktionsstudien der Proteine durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass sowohl rekombinante als auch überexprimierte 5-LO an den Tumorsuppressor p53 binden

können. Nachfolgende Reporter-gen-Analysen zeigten einen deutlichen Effekt der 5-LO auf die p53-vermittelte Expression. Dabei induzierte überexprimierte 5-LO eine deutlich verminderte Promotoraktivität des p53-regulierten, pro-apoptotischen Targetgens *BAX*.

Zusätzlich konnte eine Expressionsänderung von den p53-regulierten Targetgenen *CDKN1A* (*Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitor 1A (p21)*), *DDB2* (*Damaged-DNA-binding-Protein 2*), *PCNA* (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) und *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) in 5-LO-überexprimierenden U2OS-Zellen beobachtet werden.

Phänotypische und genotypische Charakterisierungen von 5-LO-Knockdown-Zellen (U2OS und HCT116) zeigten, neben einer signifikanten Abnahme der *ALOX5*-Transkripte, zusätzlich eine drastische Abnahme der *TP53* Expression. Da für überexprimierte 5-LO erhöhte proliferierende- und anti-apoptotische Eigenschaften beobachtet werden konnten, wurde die Apoptoserate in den 5-LO-Knockdown Zellen überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der früh-apoptotischen Zellen bei den untersuchten Zelllinien HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-} nach dem 5-LO-Knockdown höher als bei den Kontrollzellen (5-LO-WT) war. Zusätzlich konnte eine Zunahme der früh-apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Act.D oder Eto induziert werden.

Referenzen

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell*. 100 (2000) 57–70.
- [2] D. Hanahan, R. a Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation., *Cell*. 144 (2011) 646–74.
- [3] D.B. Longley, P.G. Johnston, Molecular mechanisms of drug resistance., *J. Pathol.* 205 (2005) 275–92.
- [4] J. Ferlay, I. Soerjomataram I, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012., *Int. J. Cancer*. 00 (2014).
- [5] J. Ananiev, G. Tchernev, J.W. Patterson, M. Gulubova, G. Ganchev, p53 - “The Guardian of Genome,” *Acta Medica Bulg.* 38 (2011) 72–82.
- [6] R.S.Y. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 87.
- [7] X. Lu, D.P. Lane, Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?, *Cell*. 75 (1993) 765–778.
- [8] W. Maltzman, L. Czyzyk, UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells., *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 1689–1694.
- [9] M.B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R.W. Craig, Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.* 51 (1991) 6304–6311.
- [10] Q. Zhan, F. Carrier, A.J. Fornace, Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest., *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 4242–50.
- [11] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control., *Nat. Med.* 10 (2004) 789–99.
- [12] A. Sigal, V. Rotter, Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome, *Cancer Res.* 60 (2000) 6788–6793.
- [13] A.J. Levine, The tumor suppressor genes., *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 623–651.
- [14] D.I. Linzer, A.J. Levine, Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells., *Cell*. 17 (1979) 43–52.
- [15] A.E. Smith, R. Smith, E. Paucha, Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40., *Cell*. 18 (1979) 335–346.

- [16] D.P. Lane, L. V Crawford, T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells., *Nature*. 278 (1979) 261–3.
- [17] M. Kress, E. May, R. Cassingena, P. May, Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum., *J. Virol.* 31 (1979) 472–483.
- [18] P. Sarnow, Y.S. Ho, J. Williams, A.J. Levine, Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells., *Cell*. 28 (1982) 387–394.
- [19] G. Shaulsky, N. Goldfinger, A. Ben-Ze'ev, V. Rotter, Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis., *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 6565–6577.
- [20] C.A. Finlay, P.W. Hinds, A.J. Levine, The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation., *Cell*. 57 (1989) 1083–1093.
- [21] O.W. McBride, D. Merry, D. Givol, The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13)., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 130–4.
- [22] P. May, E. May, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein., *Oncogene*. 18 (1999) 7621–7636.
- [23] M. Gomez-Lazaro, F.J. Fernandez-Gomez, J. Jordán, p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection., *J. Physiol. Biochem.* 60 (2004) 287–307.
- [24] K. a McBride, M.L. Ballinger, E. Killick, J. Kirk, M.H.N. Tattersall, R. a Eeles, et al., Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management., *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11 (2014) 260–71.
- [25] P. Dall'Igna, C. Virgone, G.L. De Salvo, R. Bertorelle, P. Indolfi, A. De Paoli, et al., Adrenocortical tumors in Italian children: analysis of clinical characteristics and P53 status. Data from the national registries., *J. Pediatr. Surg.* 49 (2014) 1367–71.
- [26] R.F. Boynton, P.L. Blount, J. Yin, V.L. Brown, Y. Huang, Y. Tong, et al., Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 3385–8.
- [27] K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53., *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 594–604.
- [28] K. Roemer, Mutant p53: Gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators, *Biol. Chem.* 380 (1999) 879–887.
- [29] C. Bertoli, J.M. Skotheim, R. a M. de Bruin, Control of cell cycle transcription during G1 and S phases., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 518–28.
- [30] K. a. Schafer, The cell cycle: a review., *Vet. Pathol.* 35 (1998) 461–78.

- [31] M.B. Kastan, J. Bartek, Cell-cycle checkpoints and cancer., *Nature*. 432 (2004) 316–23.
- [32] J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases., *Cell*. 75 (1993) 805–16.
- [33] H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, et al., 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression., *Mol. Cell*. 1 (1997) 3–11.
- [34] L. Zhang, Z. Yang, Y. Liu, GADD45 proteins: roles in cellular senescence and tumor development., *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 239 (2014) 773–778.
- [35] W.S. el-Deiry, T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, et al., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression., *Cell*. 75 (1993) 817–25.
- [36] J. Schwaller, T. Pabst, H.P. Koeffler, G. Niklaus, P. Loetscher, M.F. Fey, et al., Expression and regulation of G1 cell-cycle inhibitors (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D) in human acute myeloid leukemia and normal myeloid cells., *Leukemia*. 11 (1997) 54–63.
- [37] J. Magae, C.L. Wu, S. Illenye, E. Harlow, N.H. Heintz, Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members., *J. Cell Sci.* 109 (Pt 7 (1996) 1717–26.
- [38] J.M. Schattenberg, P.R. Galle, M. Schuchmann, Apoptosis in liver disease., *Liver Int*. 26 (2006) 904–11.
- [39] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br. J. Cancer*. 26 (1972) 239–57.
- [40] K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, M.E. Peter, Apoptosis signaling by death receptors., *Eur. J. Biochem*. 254 (1998) 439–59.
- [41] P.M. Chaudhary, M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, L. Hood, Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway., *Immunity*. 7 (1997) 821–830.
- [42] a. Ashkenazi, V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation., *Science*. 281 (1998) 1305–1308.
- [43] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death., *Toxicol. Pathol*. 35 (2007) 495–516.
- [44] T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine, Transcriptional control of human p53-regulated genes., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 9 (2008) 402–12.
- [45] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis., *Nature*. 407 (2000) 770–6.

- [46] J.E. Chipuk, D.R. Green, PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis., *Cell Cycle*. 8 (2009) 2692–6.
- [47] S. Hector, J.H.M. Prehn, Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review., *Biochim. Biophys. Acta*. 1795 (2009) 117–29.
- [48] R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 47–59.
- [49] Y. Barak, T. Juven, R. Haffner, M. Oren, mdm2 expression is induced by wild type p53 activity., *EMBO J.* 12 (1993) 461–468.
- [50] M.S. Rodriguez, J.M. Desterro, S. Lain, D.P. Lane, R.T. Hay, Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation., *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 8458–67.
- [51] M.A. Lohrum, D.B. Woods, R.L. Ludwig, E. Bálint, K.H. Vousden, C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export., *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 8521–32.
- [52] C.C.-K. Chao, Mechanisms of p53 degradation., *Clin. Chim. Acta*. 438C (2014) 139–147.
- [53] D.A. Freedman, A.J. Levine, Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6., *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 7288–7293.
- [54] L. Wang, G. He, P. Zhang, X. Wang, M. Jiang, L. Yu, Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53., *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 229–36.
- [55] P.J. Barr, L.D. Tomei, Apoptosis and its role in human disease., *Biotechnology. (N. Y.)*. 12 (1994) 487–93.
- [56] A.J. Levine, M. Oren, The first 30 years of p53: growing ever more complex., *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 749–58.
- [57] K.H. Vousden, K.M. Ryan, P53 and Metabolism., *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 691–700.
- [58] M.F. Lavin, N. Gueven, The complexity of p53 stabilization and activation., *Cell Death Differ.* 13 (2006) 941–50.
- [59] M. Athar, C.A. Elmets, L. Kopelovich, Pharmacological activation of p53 in cancer cells., *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 631–9.
- [60] Y. Qian, X. Chen, Senescence regulation by the p53 protein family., *Methods Mol. Biol.* 965 (2013) 37–61.
- [61] S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, Y. Haupt, Apoptosis - the p53 network., *J. Cell Sci.* 116 (2003) 4077–85.

- [62] J.S. Fridman, S.W. Lowe, Control of apoptosis by p53., *Oncogene*. 22 (2003) 9030–40.
- [63] G. Makin, J. a. Hickman, Apoptosis and cancer chemotherapy., *Cell Tissue Res*. 301 (2000) 143–152.
- [64] A.L. Okorokov, E. V Orlova, Structural biology of the p53 tumour suppressor., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19 (2009) 197–202.
- [65] J. Chang, D.H. Kim, Seung Woo Lee, Kwan Yong Choi, Young Chul Sung, Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 25014–25019.
- [66] P.H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A.J. Levine, et al., Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain., *Science*. (1996).
- [67] C.J. Thut, J.L. Chen, R. Klemm, R. Tjian, p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60., *Science*. (1995).
- [68] P. Di Lello, L.M.M. Jenkins, T.N. Jones, B.D. Nguyen, T. Hara, H. Yamaguchi, et al., Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIF and the activation domain of p53., *Mol. Cell*. 22 (2006) 731–40.
- [69] K.K. Walker, A.J. Levine, Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 15335–15340.
- [70] J. Bargonetti, J.J. Manfredi, X. Chen, D.R. Marshak, C. Prives, A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein., *Genes Dev.* 7 (1993) 2565–74.
- [71] P. Balagurumoorthy, H. Sakamoto, M.S. Lewis, N. Zambrano, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, et al., Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8591–8595.
- [72] A.C. Joerger, M.D. Allen, A.R. Fersht, Crystal structure of a superstable mutant of human p53 core domain. Insights into the mechanism of rescuing oncogenic mutations., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1291–6.
- [73] W.S. el-Deiry, S.E. Kern, J.A. Pietenpol, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Definition of a consensus binding site for p53., *Nat. Genet.* 1 (1992) 45–49.
- [74] G.M. Clore, J. Ernst, R. Clubb, J.G. Omichinski, W.M. Kennedy, K. Sakaguchi, et al., Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53., *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 321–333.

- [75] P.D. Jeffrey, S. Gorina, N.P. Pavletich, Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms., *Science*. (1995).
- [76] A.C. Joerger, A.R. Fersht, Structural biology of the tumor suppressor p53., *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 557–82.
- [77] W. Gu, R.G. Roeder, Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain, *Cell*. 90 (1997) 595–606.
- [78] L. Liu, D.M. Scolnick, R.C. Trievel, H.B. Zhang, R. Marmorstein, T.D. Halazonetis, et al., p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage., *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1202–9.
- [79] a Ito, C.H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M.H. Hamilton, E. Appella, et al., p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2., *EMBO J.* 20 (2001) 1331–40.
- [80] T. Göhler, M. Reimann, D. Cherny, K. Walter, G. Warnecke, E. Kim, et al., Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41192–203.
- [81] K. McKinney, M. Mattia, V. Gottifredi, C. Prives, p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus., *Mol. Cell.* 16 (2004) 413–24.
- [82] Y.L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, Post-translational modifications in signal integration., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (2010) 666–72.
- [83] A.M. Bode, Z. Dong, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis., *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 793–805.
- [84] C.L. Brooks, W. Gu, Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: The molecular basis for p53 regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 164–171.
- [85] a Olsson, C. Manzl, a Strasser, a Villunger, How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 1561–75.
- [86] S.Y. Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, C. Prives, DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2., *Cell*. 91 (1997) 325–34.
- [87] Y. Tang, J. Luo, W. Zhang, W. Gu, Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis., *Mol. Cell.* 24 (2006) 827–39.
- [88] A. Ito, Y. Kawaguchi, C.-H. Lai, J.J. Kovacs, Y. Higashimoto, E. Appella, et al., MDM2–HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation, *EMBO J.* 21 (2002) 6236–6245.
- [89] H. Vaziri, S.K. Dessain, E. Ng Eaton, S.I. Imai, R.A. Frye, T.K. Pandita, et al., hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase., *Cell*. 107 (2001) 149–59.

- [90] J. Huang, R. Sengupta, A.B. Espejo, M.G. Lee, J. a Dorsey, M. Richter, et al., p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1., *Nature*. 449 (2007) 105–8.
- [91] F. Murray-Zmijewski, E. a Slee, X. Lu, A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 702–12.
- [92] J.M. Espinosa, Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network., *Oncogene*. 27 (2008) 4013–23.
- [93] K.H. Vousden, C. Prives, Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53., *Cell*. 137 (2009) 413–31.
- [94] G. D’Orazi, B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, et al., Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis., *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 11–9.
- [95] N. Taira, K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki, K. Yoshida, DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage., *Mol. Cell*. 25 (2007) 725–38.
- [96] D. V Bulavin, S. Saito, M.C. Hollander, K. Sakaguchi, C.W. Anderson, E. Appella, et al., Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation., *EMBO J.* 18 (1999) 6845–54.
- [97] L.D. Mayo, Y.R. Seo, M.W. Jackson, M.L. Smith, J. Rivera Guzman, C.K. Korgaonkar, et al., Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25953–9.
- [98] T.G. Hofmann, A. Möller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Dröge, et al., Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2., *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 1–10.
- [99] K. Yoshida, H. Liu, Y. Miki, Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage., *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5734–40.
- [100] R. Okoshi, T. Ozaki, H. Yamamoto, K. Ando, N. Koida, S. Ono, et al., Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3979–87.
- [101] J.-L. Perfettini, M. Castedo, R. Nardacci, F. Ciccocanti, P. Boya, T. Roumier, et al., Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope., *J. Exp. Med.* 201 (2005) 279–89.
- [102] K. Sakaguchi, J.E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, et al., DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, *Genes Dev.* 12 (1998) 2831–2841.
- [103] L. Le Cam, L.K. Linares, C. Paul, E. Julien, M. Lacroix, E. Hatchi, et al., E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation., *Cell*. 127 (2006) 775–88.

- [104] D. Marouco, A. V Garabadgiu, G. Melino, N.A. Barlev, Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death?, *Oncotarget*. 4 (2013) 1556–71.
- [105] S. Cawley, S. Bekiranov, H.H. Ng, P. Kapranov, E.A. Sekinger, D. Kampa, et al., Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs., *Cell*. 116 (2004) 499–509.
- [106] J.M. Hearnese, D.J. Mays, K.L. Schavolt, L. Tang, X. Jiang, J. a Pietenpol, Chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional genomic binding sites for sequence-specific transactivators., *Mol. Cell. Biol*. 25 (2005) 10148–58.
- [107] C.-L. Wei, Q. Wu, V.B. Vega, K.P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, et al., A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome., *Cell*. 124 (2006) 207–19.
- [108] L. Smeenk, S.J. van Heeringen, M. Koeppel, M. a van Driel, S.J.J. Bartels, R.C. Akkers, et al., Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response., *Nucleic Acids Res*. 36 (2008) 3639–54.
- [109] W.D. Funk, D.T. Pak, R.H. Karas, W.E. Wright, J.W. Shay, A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes., *Mol. Cell. Biol*. 12 (1992) 2866–2871.
- [110] Y. Wang, M. Reed, P. Wang, J.E. Stenger, G. Mayr, M.E. Anderson, et al., p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions., *Genes Dev*. 7 (1993) 2575–2586.
- [111] A. Saramäki, C.M. Banwell, M.J. Campbell, C. Carlberg, Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor., *Nucleic Acids Res*. 34 (2006) 543–54.
- [112] J.C. Bourdon, V. Deguin-Chambon, J.C. Lelong, P. Dessen, P. May, B. Debuire, et al., Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53., *Oncogene*. 14 (1997) 85–94.
- [113] Y. Cho, S. Gorina, P.D. Jeffrey, N.P. Pavletich, Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations., *Science*. 265 (1994) 346–55.
- [114] J.J. Jordan, D. Menendez, A. Inga, M. Noureddine, M. Nourredine, D. a Bell, et al., Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53., *PLoS Genet*. 4 (2008) e1000104.
- [115] J. Yan, D. Menendez, X.-P. Yang, M. a Resnick, A.M. Jetten, A regulatory loop composed of RAP80-HDM2-p53 provides RAP80-enhanced p53 degradation by HDM2 in response to DNA damage., *J. Biol. Chem*. 284 (2009) 19280–9.
- [116] a. K. Nagaich, E. Appella, R.E. Harrington, DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53., *J. Biol. Chem*. 272 (1997) 14842–14849.

- [117] A.K. Nagaich, D. Bhattacharyya, S.K. Bhattacharya, M. Bansal, CA/TG Sequence at the 5' end of Oligo(A)-tracts strongly modulates DNA curvature, *J. Biol. Chem.* (1994).
- [118] N. Link, P. Kurtz, M. O'Neal, G. Garcia-Hughes, J.M. Abrams, A p53 enhancer region regulates target genes through chromatin conformations in cis and in trans., *Genes Dev.* 27 (2013) 2433–8.
- [119] C. a Melo, J. Drost, P.J. Wijchers, H. van de Werken, E. de Wit, J. a F. Oude Vrielink, et al., eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription., *Mol. Cell.* 49 (2013) 524–35.
- [120] D.P. Teufel, S.M. Freund, M. Bycroft, A.R. Fersht, Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 7009–14.
- [121] M. Wells, H. Tidow, T.J. Rutherford, P. Markwick, M.R. Jensen, E. Mylonas, et al., Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5762–7.
- [122] D. Menendez, A. Inga, M. a Resnick, The expanding universe of p53 targets., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 724–37.
- [123] U.P. Kelavkar, K.F. Badr, Effects of mutant p53 expression on human 15-lipoxygenase-promoter activity and murine 12/15-lipoxygenase gene expression: evidence that 15-lipoxygenase is a mutator gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4378–83.
- [124] S.S. Mello, L.D. Attardi, Not all p53 gain-of-function mutants are created equal., *Cell Death Differ.* 20 (2013) 855–7.
- [125] H. Viadiu, Molecular architecture of tumor suppressor p53., *Curr. Top. Med. Chem.* 8 (2008) 1327–34.
- [126] I. Goldstein, V. Marcel, M. Olivier, M. Oren, V. Rotter, P. Hainaut, Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies., *Cancer Gene Ther.* 18 (2011) 2–11.
- [127] M. Oren, V. Rotter, Mutant p53 gain-of-function in cancer., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a001107.
- [128] J. Sampath, D. Sun, V.J. Kidd, J. Grenet, a Gandhi, L.H. Shapiro, et al., Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39359–67.
- [129] M.W. Frazier, X. He, J. Wang, Z. Gu, J.L. Cleveland, G.P. Zambetti, Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain., *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 3735–43.
- [130] A. Zalcenstein, P. Stambolsky, L. Weisz, M. Müller, D. Wallach, T.M. Goncharov, et al., Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants., *Oncogene.* 22 (2003) 5667–76.

- [131] L. Weisz, A. Zalcenstein, P. Stambolsky, Y. Cohen, N. Goldfinger, M. Oren, Transactivation of the EGR1 Gene Contributes to Mutant p53 Gain of Function, (2004) 8318–8327.
- [132] M. Olivier, a Petitjean, V. Marcel, a Pétré, M. Mounawar, a Plymoth, et al., Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective., *Cancer Gene Ther.* 16 (2009) 1–12.
- [133] D. Steinhilber, M. Brungs, O. Werz, I. Wiesenberg, C. Danielsson, J.P. Kahlen, et al., The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7037–40.
- [134] D. Steinhilber, 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity., *Pharm. Acta Helv.* 69 (1994) 3–14.
- [135] O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity., *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 332–41.
- [136] O. Rådmark, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation., *J. Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S40–5.
- [137] O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors., *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 701–18.
- [138] H. Ohnishi, N. Miyahara, E.W. Gelfand, The role of leukotriene B(4) in allergic diseases., *Allergol. Int.* 57 (2008) 291–8.
- [139] R.M. Palmer, R.J. Stepney, G.A. Higgs, K.E. Eakins, Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species., *Prostaglandins.* 20 (1980) 411–8.
- [140] C.-H. Woo, M.-H. Yoo, H.-J. You, S.-H. Cho, Y.-C. Mun, C.-M. Seong, et al., Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B4 is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase-linked cascade., *J. Immunol.* 170 (2003) 6273–6279.
- [141] S.W. Crooks, R.A. Stockley, Leukotriene B4., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 173–178.
- [142] K.A. Yamaoka, B. Dugas, N. Paul-Eugene, J.M. Mencia-Huerta, P. Braquet, J.P. Kolb, Leukotriene B4 enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes., *Cell. Immunol.* 156 (1994) 124–34.
- [143] T.S. Hallstrand, Y. Lai, W.R. Henderson, W.A. Altemeier, M.H. Gelb, Epithelial regulation of eicosanoid production in asthma., *Pulm. Pharmacol. Ther.* 25 (2012) 432–7.
- [144] A. Niimi, Cough, asthma, and cysteinyl-leukotrienes., *Pulm. Pharmacol. Ther.* 26 (2013) 514–9.

- [145] S. Cuzzocrea, A. Rossi, I. Serraino, R. Di Paola, L. Dugo, T. Genovese, et al., 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein., *Immunology*. 110 (2003) 120–30.
- [146] C.G. Irvin, Y.P. Tu, J.R. Sheller, C.D. Funk, 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice., *Am. J. Physiol.* 272 (1997) L1053–8.
- [147] X.S. Chen, J.R. Sheller, E.N. Johnson, C.D. Funk, Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene., *Nature*. 372 (1994) 179–82.
- [148] M. Peters-Golden, M. Bailie, T. Marshall, C. Wilke, S.H. Phan, G.B. Toews, et al., Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 229–235.
- [149] D. Wang, R.N. Dubois, Eicosanoids and cancer., *Nat. Rev. Cancer*. 10 (2010) 181–93.
- [150] E. Elinav, R. Nowarski, C. a Thaïss, B. Hu, C. Jin, R. a Flavell, Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms., *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 759–71.
- [151] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer., *Cell*. 140 (2010) 883–99.
- [152] D. Steinhilber, A.S. Fischer, J. Metzner, S.D. Steinbrink, J. Roos, M. Ruthardt, et al., 5-Lipoxygenase: Underappreciated Role of a Pro-Inflammatory Enzyme in Tumorigenesis., *Front. Pharmacol.* 1 (2010) 143.
- [153] M. Maccarrone, M. V Catani, a F. Agrò, G. Melino, Involvement of 5-lipoxygenase in programmed cell death of cancer cells., *Cell Death Differ.* 4 (1997) 396–402.
- [154] R.E. Harris, B.C. Casto, Z.M. Harris, Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer., *World J. Clin. Oncol.* 5 (2014) 677–92.
- [155] P. Guillem-Llobat, M. Dovizio, S. Alberti, A. Bruno, P. Patrignani, Platelets, cyclooxygenases, and colon cancer., *Semin. Oncol.* 41 (2014) 385–96.
- [156] X. Chen, S. Sood, C.S. Yang, N. Li, Z. Sun, Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcino-genesis and cancer chemoprevention., *Curr. Cancer Drug Targets*. 6 (2006) 613–622.
- [157] X.-Z. Ding, W.-G. Tong, T.E. Adrian, Multiple signal pathways are involved in the mitogenic effect of 5(S)-HETE in human pancreatic cancer., *Oncology*. 65 (2003) 285–294.
- [158] W.-G. Tong, X.-Z. Ding, M.S. Talamonti, R.H. Bell, T.E. Adrian, LTB₄ stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335 (2005) 949–956.

- [159] T. Tsukada, K. Nakashima, S. Shirakawa, Arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors show potent antiproliferative effects on human leukemia cell lines., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140 (1986) 832–836.
- [160] J. Ghosh, C.E. Myers, Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13182–7.
- [161] K. Datta, S.S. Biswal, J.P. Kehrer, The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP., *Biochem. J.* 340 (Pt 2 (1999) 371–375.
- [162] E. Ricciotti, G. a Fitzgerald, Prostaglandins and inflammation., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 986–1000.
- [163] Y. Zhao, W. Wang, Q. Wang, X. Zhang, L. Ye, Lipid metabolism enzyme 5-LOX and its metabolite LTB4 are capable of activating transcription factor NF- κ B in hepatoma cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418 (2012) 647–51.
- [164] S. Pal, A. Bhattacharjee, A. Ali, N.C. Mandal, S.C. Mandal, M. Pal, Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor κ B and p53 mutual antagonism., *J. Inflamm. (Lond).* 11 (2014) 23.
- [165] K.-S. Chun, Y.-J. Surh, Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention., *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1089–100.
- [166] I. Müller, S. Beissert, D. Kulms, Anti-apoptotic NF κ B and “Gain of Function” mutant p53 in Concert Act Pro-Apoptotic in Response to UVB+IL-1 via Enhanced TNF Production., *J. Invest. Dermatol.* (2014).
- [167] T. Cooks, I.S. Pateras, O. Tarcic, H. Solomon, A.J. Schetter, S. Wilder, et al., Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer., *Cancer Cell.* 23 (2013) 634–46.
- [168] B. Hoesel, J. a Schmid, The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer., *Mol. Cancer.* 12 (2013) 86.
- [169] T. Lawrence, The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (2009) a001651.
- [170] B. Huang, X.-D. Yang, A. Lamb, L.-F. Chen, Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway., *Cell. Signal.* 22 (2010) 1282–90.
- [171] B. Razani, B. Zarnegar, A.J. Ytterberg, T. Shiba, P.W. Dempsey, C.F. Ware, et al., Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation., *Sci. Signal.* 3 (2010) ra41.
- [172] P.P. Tak, G.S. Firestein, NF- κ B: A key role in inflammatory diseases, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 7–11.

- [173] M.R. Edwards, N.W. Bartlett, D. Clarke, M. Birrell, M. Belvisi, S.L. Johnston, Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease., *Pharmacol. Ther.* 121 (2009) 1–13.
- [174] S.S. Makarov, NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction., *Arthritis Res.* 3 (2001) 200–6.
- [175] C.C. King, M. Sastri, P. Chang, J. Pennypacker, S.S. Taylor, The rate of NF- κ B nuclear translocation is regulated by PKA and A kinase interacting protein 1., *PLoS One.* 6 (2011) e18713.
- [176] A. Blaecke, Y. Delneste, N. Herbault, P. Jeannin, J.-Y. Bonnefoy, A. Beck, et al., Measurement of nuclear factor-kappa B translocation on lipopolysaccharide-activated human dendritic cells by confocal microscopy and flow cytometry., *Cytometry.* 48 (2002) 71–9.
- [177] a. Khoshnan, C. Tindell, I. Laux, D. Bae, B. Bennett, a. E. Nel, The NF- B Cascade Is Important in Bcl-xL Expression and for the Anti-Apoptotic Effects of the CD28 Receptor in Primary Human CD4+ Lymphocytes, *J. Immunol.* 165 (2000) 1743–1754.
- [178] K. Wang, J.J. Brems, R.L. Gamelli, A.-X. Holterman, Survivin signaling is regulated through nuclear factor-kappa B pathway during glycochenodeoxycholate-induced hepatocyte apoptosis., *Biochim. Biophys. Acta.* 1803 (2010) 1368–75.
- [179] C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D. V Goeddel, A.S. Baldwin, NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation., *Science.* 281 (1998) 1680–3.
- [180] L. Ji, M. Arcinas, L.M. Boxer, NF-kappa B sites function as positive regulators of expression of the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma., *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 7967–74.
- [181] K. Klapproth, S. Sander, D. Marinkovic, B. Baumann, T. Wirth, The IKK2/NF-{kappa}B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis., *Blood.* 114 (2009) 2448–58.
- [182] B. Poligone, a S. Baldwin, Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38658–64.
- [183] B. Sun, M. Karin, NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents., *Oncogene.* 27 (2008) 6228–44.
- [184] F.X. Bosch, J. Ribes, M. Díaz, R. Cléries, Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends, *Gastroenterology.* 127 (2004) S5–S16.
- [185] J.A. Eaden, K.R. Abrams, J.F. Mayberry, The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis., *Gut.* 48 (2001) 526–35.
- [186] M. Karin, Y. Cao, F.R. Greten, Z.-W. Li, NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit., *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 301–10.

- [187] V. Baud, M. Karin, Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls., *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 33–40.
- [188] H. Tsai, W. Lee, P. Wang, K. Cheng, Y. Chen, S. Shen, Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF- κ B and AP-1 activation in macrophages., *J. Dermatol. Sci.* 69 (2013) 122–31.
- [189] K. Bensaad, K.H. Vousden, Savior and slayer: the two faces of p53., *Nat. Med.* 11 (2005) 1278–1279.
- [190] K. Harms, S. Nozell, X. Chen, The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors., *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 822–42.
- [191] R. Brosh, V. Rotter, When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 701–13.
- [192] N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, M.T. Waight, D.B. Neau, W.E. Boeglin, A.R. Brash, et al., The structure of human 5-lipoxygenase., *Science.* 331 (2011) 217–9.
- [193] J.Z. Haeggström, C.D. Funk, Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease., *Chem. Rev.* 111 (2011) 5866–98.
- [194] T. Hammarberg, P. Provost, B. Persson, O. Rådmark, The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38787–93.
- [195] S. Kulkarni, S. Das, C.D. Funk, D. Murray, W. Cho, Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13167–74.
- [196] M.D. Percival, Human 5-lipoxygenase contains an essential iron., *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10058–61.
- [197] Y.Y. Zhang, T. Hammarberg, O. Radmark, B. Samuelsson, C.F. Ng, C.D. Funk, et al., Analysis of a nucleotide-binding site of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences., *Biochem. J.* 351 Pt 3 (2000) 697–707.
- [198] C. Hörnig, D. Albert, L. Fischer, M. Hörnig, O. Rådmark, D. Steinhilber, et al., 1-Oleoyl-2-acetylgllycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 26913–21.
- [199] C.D. Funk, S. Hoshiko, T. Matsumoto, O. Rdmark, B. Samuelsson, Characterization of the human 5-lipoxygenase gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 2587–91.
- [200] E.S. Silverman, J. Du, G.T. De Sanctis, O. Rådmark, B. Samuelsson, J.M. Drazen, et al., Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (1998) 316–23.

- [201] E.S. Silverman, J.M. Drazen, Genetic variations in the 5-lipoxygenase core promoter. Description and functional implications., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) S77–80.
- [202] S. Hoshiko, O. Rådmark, B. Samuelsson, Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 9073–7.
- [203] W.S. Dynan, R. Tjian, Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II., *Cell.* 32 (1983) 669–80.
- [204] M.R. Briggs, J.T. Kadonaga, S.P. Bell, R. Tjian, Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1., *Science.* 234 (1986) 47–52.
- [205] G. Thiel, G. Cibelli, Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1., *J. Cell. Physiol.* 193 (2002) 287–92.
- [206] C.P. Lim, N. Jain, X. Cao, Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1., *Oncogene.* 16 (1998) 2915–26.
- [207] G. Bonizzi, J. Piette, S. Schoonbroodt, R. Greimers, L. Havard, M.P. Merville, et al., Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity., *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1950–60.
- [208] R. Wisastra, F.J. Dekker, Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked., *Cancers (Basel).* 6 (2014) 1500–21.
- [209] G.J. Nabel, I.M. Verma, Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature., *Genes Dev.* 7 (1993) 2063.
- [210] H.J. Dyson, E. Komives, Role of disorder in IκB-NFκB interaction., *IUBMB Life.* 64 (2012) 499–505.
- [211] D.J. Van Antwerp, S.J. Martin, I.M. Verma, D.R. Green, Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B., *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 107–11.
- [212] M. Barkett, T.D. Gilmore, Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors., *Oncogene.* 18 (1999) 6910–24.
- [213] D. Steinhilber, O. Rådmark, B. Samuelsson, Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 5984–8.
- [214] M. Brungs, O. Rådmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 107–11.
- [215] O.P. Rådmark, The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) S11–5.

- [216] U. Janssen-Timmen, P.J. Vickers, U. Wittig, W.D. Lehmann, H.J. Stark, N.E. Fusenig, et al., Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 6966–70.
- [217] T.K. Wöbke, B.L. Sorg, D. Steinhilber, Vitamin D in inflammatory diseases., *Front. Physiol.* 5 (2014) 244.
- [218] B.L. Sorg, N. Klan, S. Seuter, D. Dishart, O. Rådmark, A. Habenicht, et al., Analysis of the 5-lipoxygenase promoter and characterization of a vitamin D receptor binding site., *Biochim. Biophys. Acta.* 1761 (2006) 686–97.
- [219] K.L. Stoffers, B.L. Sorg, S. Seuter, O. Rau, O. Rådmark, D. Steinhilber, Calcitriol upregulates open chromatin and elongation markers at functional vitamin D response elements in the distal part of the 5-lipoxygenase gene., *J. Mol. Biol.* 395 (2010) 884–96.
- [220] S. Seuter, S. Väisänen, O. Rådmark, C. Carlberg, D. Steinhilber, Functional characterization of vitamin D responding regions in the human 5-Lipoxygenase gene., *Biochim. Biophys. Acta.* 1771 (2007) 864–72.
- [221] D. Steinhilber, S. Hoshiko, J. Grunewald, O. Rådmark, B. Samuelsson, Serum factors regulate 5-lipoxygenase activity in maturing HL60 cells., *Biochim. Biophys. Acta.* 1178 (1993) 1–8.
- [222] O. Werz, J. Klemm, B. Samuelsson, O. Rådmark, Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes, *Blood.* 97 (2001) 2487–2495.
- [223] J. Uhl, N. Klan, M. Rose, K.-D. Entian, O. Werz, D. Steinhilber, The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4374–9.
- [224] J.W. Woods, M.J. Coffey, T.G. Brock, I.I. Singer, M. Peters-Golden, 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation., *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2035–46.
- [225] S. Kargman, P. Prasit, J.F. Evans, Translocation of HL-60 cell 5-lipoxygenase. Inhibition of A23187- or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced translocation by indole and quinoline leukotriene synthesis inhibitors., *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23745–52.
- [226] M. Peters-Golden, R.W. McNish, Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 147–53.
- [227] X.S. Chen, Y.Y. Zhang, C.D. Funk, Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31237–44.
- [228] T.G. Brock, R.W. McNish, M. Peters-Golden, Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21652–21658.

- [229] R. Spanbroek, H.J. Stark, U. Janssen-Timmen, S. Kraft, M. Hildner, T. Andl, et al., 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 663–8.
- [230] H. Hanaka, T. Shimizu, T. Izumi, Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase., *Biochem. J.* 361 (2002) 505–14.
- [231] M. Luo, C.W.M. Pang, A.E. Gerken, T.G. Brock, Multiple nuclear localization sequences allow modulation of 5-lipoxygenase nuclear import., *Traffic.* 5 (2004) 847–54.
- [232] M. Noguchi, M. Miyano, T. Matsumoto, M. Noma, Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA4 synthetase activity., *Biochim. Biophys. Acta.* 1215 (1994) 300–6.
- [233] M. Peters-Golden, T.G. Brock, 5-Lipoxygenase and FLAP, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 69 (2003) 99–109.
- [234] A.K. Mandal, P.B. Jones, A.M. Bair, P. Christmas, D. Miller, T.D. Yamin, et al., The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 20434–9.
- [235] M. Pouliot, P.P. McDonald, E. Krump, J. a. Mancini, S.R. McColl, P.K. Weech, et al., Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils., *Eur. J. Biochem.* 238 (1996) 250–258.
- [236] O. Werz, J. Klemm, B. Samuelsson, O. Rådmark, 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5261–6.
- [237] O. Werz, 5-Lipoxygenase: Cellular Biology and Molecular Pharmacology., *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* 1 (2002) 23–44.
- [238] M. Luo, S.M. Jones, N. Flamand, D.M. Aronoff, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40609–16.
- [239] N. Flamand, M. Luo, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Phosphorylation of serine 271 on 5-lipoxygenase and its role in nuclear export., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 306–13.
- [240] P. Provost, J. Doucet, T. Hammarberg, G. Gerisch, B. Samuelsson, O. Radmark, 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16520–7.
- [241] P. Provost, B. Samuelsson, O. Rådmark, Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 1881–5.
- [242] V. Dincbas-Renqvist, G. Pépin, M. Rakonjac, I. Plante, D.L. Ouellet, A. Hermansson, et al., Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain., *Biochim. Biophys. Acta.* 1789 (2009) 99–108.

- [243] R. a Lepley, F. a Fitzpatrick, 5-Lipoxygenase contains a functional Src homology 3-binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 24163–8.
- [244] Y. Ye, Y. Lin, J.R. Perez-Polo, B.F. Uretsky, Z. Ye, B.C. Tieu, et al., Phosphorylation of 5-lipoxygenase at ser523 by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B4 or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin a4 production., *J. Immunol.* 181 (2008) 3515–3523.
- [245] A. Catalano, P. Caprari, S. Soddu, A. Procopio, M. Romano, 5-Lipoxygenase Antagonizes Genotoxic Stress-Induced Apoptosis By Altering P53 Nuclear Trafficking., *FASEB J.* 18 (2004) 1740–2.
- [246] A. Catalano, P. Caprari, S. Soddu, A. Procopio, M. Romano, 5-Lipoxygenase Antagonizes Genotoxic Stress-Induced Apoptosis By Altering P53 Nuclear Trafficking., *FASEB J.* 18 (2004) 1740–2.
- [247] A. Catalano, S. Rodilossi, P. Caprari, V. Coppola, A. Procopio, 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation., *EMBO J.* 24 (2005) 170–9.
- [248] Y. Torosyan, A. Dobi, S. Naga, K. Mezhevaya, M. Glasman, C. Norris, et al., Distinct effects of annexin A7 and p53 on arachidonate lipoxygenation in prostate cancer cells involve 5-lipoxygenase transcription., *Cancer Res.* 66 (2006) 9609–16.
- [249] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature.* 227 (1970) 680–5.
- [250] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods.* 25 (2001) 402–8.
- [251] C. Demaison, K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer, C. Kinnon, et al., High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter., *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 803–13.
- [252] L. Smeenk, S.J. van Heeringen, M. Koeppe, B. Gilbert, E. Janssen-Megens, H.G. Stunnenberg, et al., Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation., *PLoS One.* 6 (2011) e17574.
- [253] O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851 (2015) 331–339.
- [254] A. O’Brate, P. Giannakakou, The importance of p53 location: Nuclear or cytoplasmic zip code?, *Drug Resist. Updat.* 6 (2003) 313–322.
- [255] S.H. Liang, M.F. Clarke, Regulation of p53 localization, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 2779–2783.

- [256] K. Holmberg Olausson, M. Nistér, M. Lindström, p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses, *Cells*. 1 (2012) 774–798.
- [257] M.T. Boyd, N. Vlatković, C.P. Rubbi, The nucleolus directly regulates p53 export and degradation, *J. Cell Biol.* 194 (2011) 689–703.
- [258] S. Gupta, M. Srivastava, N. Ahmad, K. Sakamoto, D.G. Bostwick, H. Mukhtar, Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma., *Cancer*. 91 (2001) 737–43.
- [259] a S. Fischer, J. Metzner, S.D. Steinbrink, S. Ulrich, C. Angioni, G. Geisslinger, et al., 5-Lipoxygenase inhibitors induce potent anti-proliferative and cytotoxic effects in human tumour cells independently of suppression of 5-lipoxygenase activity., *Br. J. Pharmacol.* 161 (2010) 936–49.
- [260] D.M. Green, N.E. Breslow, J.B. Beckwith, J.Z. Finklestein, P. Grundy, P.R. Thomas, et al., Effect of duration of treatment on treatment outcome and cost of treatment for Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group., *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 3744–51.
- [261] C. Mitchell, P.M. Jones, A. Kelsey, G.M. Vujanic, B. Marsden, R. Shannon, et al., The treatment of Wilms' tumour: results of the United Kingdom Children's cancer study group (UKCCSG) second Wilms' tumour study., *Br. J. Cancer*. 83 (2000) 602–8.
- [262] G.J. Veal, M. Cole, J. Errington, A. Parry, J. Hale, A.D.J. Pearson, et al., Pharmacokinetics of dactinomycin in a pediatric patient population: a United Kingdom Children's Cancer Study Group Study., *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 5893–9.
- [263] I.A. Najar, R.K. Johri, Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide, *J. Biosci.* 39 (2014) 139–144.
- [264] S.G. Arbuck, H.O. Douglass, W.R. Crom, P. Goodwin, Y. Silk, C. Cooper, et al., Etoposide pharmacokinetics in patients with normal and abnormal organ function., *J. Clin. Oncol.* 4 (1986) 1690–5.
- [265] M.L. Choong, H. Yang, M.A. Lee, D.P. Lane, Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy., *Cell Cycle*. 8 (2009) 2810–8.
- [266] B. Clifford, M. Beljin, G.R. Stark, W.R. Taylor, G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53., *Cancer Res.* 63 (2003) 4074–81.
- [267] J. a Bush, G. Li, Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters., *Int. J. Cancer*. 98 (2002) 323–30.
- [268] Z. Wang, Y. Sun, Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy., *Transl. Oncol.* 3 (2010) 1–12.
- [269] P.J. Park, ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology., *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 669–80.

- [270] C. Whibley, P.D.P. Pharoah, M. Hollstein, P53 Polymorphisms: Cancer Implications., *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 95–107.
- [271] H. Hagège, P. Klous, C. Braem, E. Splinter, J. Dekker, G. Cathala, et al., Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR)., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1722–33.
- [272] J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker, N. Kleckner, Capturing chromosome conformation., *Science.* 295 (2002) 1306–11.
- [273] J. Liu, L. Grogan, M.M. Nau, C.J. Allegra, E. Chu, J.J. Wright, Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1., *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 863–70.
- [274] H. Li, Y. Zhang, a Ströse, D. Tedesco, K. Gurova, G. Selivanova, Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53-mediated apoptosis., *Cell Death Differ.* 21 (2014) 1493–502.
- [275] M.P. Tschan, V. a Reddy, a Ressa, G. Arvidsson, M.F. Fey, B.E. Torbett, PU.1 binding to the p53 family of tumor suppressors impairs their transcriptional activity., *Oncogene.* 27 (2008) 3489–93.
- [276] S. a Innocente, J.M. Lee, p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription., *FEBS Lett.* 579 (2005) 1001–7.
- [277] G. Koutsodontis, I. Tentes, P. Papakosta, a Moustakas, D. Kardassis, Sp1 plays a critical role in the transcriptional activation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by the p53 tumor suppressor protein., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29116–25.
- [278] F. Nikulenkov, C. Spinnler, H. Li, C. Tonelli, Y. Shi, M. Turunen, et al., Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis., *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1992–2002.
- [279] R. Maruyama, F. Aoki, M. Toyota, Y. Sasaki, H. Akashi, H. Mita, et al., Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation., *Cancer Res.* 66 (2006) 4574–83.
- [280] C. Danielsson, H. Törmä, A. Vahlquist, C. Carlberg, Positive and negative interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the retinoid CD437 in the induction of human melanoma cell apoptosis., *Int. J. Cancer.* 81 (1999) 467–70.
- [281] S. a Lamprecht, M. Lipkin, Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms., *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 601–14.
- [282] T. Kumagai, J. O’Kelly, J.W. Said, H.P. Koeffler, Vitamin D2 analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells., *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 896–905.
- [283] T.C. Chen, G.G. Schwartz, K.L. Burnstein, B.L. Lokeshwar, M.F. Holick, The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1alpha,25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents for prostate cancer., *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 901–8.

- [284] J.D. Lindh, L. Björkhem-Bergman, E. Eliasson, Vitamin D and drug-metabolising enzymes., *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 1797–801.
- [285] J.W. Pike, S.M. Lee, M.B. Meyer, Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms., *Bonekey Rep.* 3 (2014) 482.
- [286] P. Stambolsky, Y. Tabach, G. Fontemaggi, L. Weisz, R. Maor-Aloni, Z. Siegfried, et al., Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53., *Cancer Cell.* 17 (2010) 273–85.
- [287] K.M. Ropponen, J.K. Kellokoski, P.K. Lipponen, T. Pietiläinen, M.J. Eskelinen, E.M. Alhava, et al., p22/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis., *Br. J. Cancer.* 81 (1999) 133–40.
- [288] L. a McPherson, A. V Loktev, R.J. Weigel, Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45028–33.
- [289] M.J. Peart, C. Prives, Mutant p53 gain of function: the NF-Y connection., *Cancer Cell.* 10 (2006) 173–4.
- [290] M.G. van Oijen, P.J. Slootweg, Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53., *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 2138–45.
- [291] U.P. Kelavkar, K.F. Badr, Effects of mutant p53 expression on human 15-lipoxygenase-promoter activity and murine 12/15-lipoxygenase gene expression: evidence that 15-lipoxygenase is a mutator gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4378–83.
- [292] D. Dittmer, S. Pati, G. Zambetti, S. Chu, A.K. Teresky, M. Moore, et al., Gain of function mutations in p53., *Nat. Genet.* 4 (1993) 42–6.
- [293] A. Lányi, D. Deb, R.C. Seymour, J.H. Ludes-Meyers, M.A. Subler, S. Deb, “Gain of function” phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain., *Oncogene.* 16 (1998) 3169–76.
- [294] J.H. Ludes-Meyers, M.A. Subler, C. V Shivakumar, R.M. Munoz, P. Jiang, J.E. Bigger, et al., Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53., *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 6009–19.
- [295] H. Werner, E. Karnieli, F.J. Rauscher, D. LeRoith, Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 8318–23.
- [296] A. Kieser, H.A. Weich, G. Brandner, D. Marmé, W. Kolch, Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression., *Oncogene.* 9 (1994) 963–9.

- [297] L. Margulies, P.B. Sehgal, Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15096–100.
- [298] C.A. Rouzer, B. Samuelsson, On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 6040–6044.
- [299] R. Natarajan, R. Esworthy, W. Bai, J.L. Gu, S. Wilczynski, J. Nadler, Increased 12-lipoxygenase expression in breast cancer tissues and cells. Regulation by epidermal growth factor., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1790–8.
- [300] U. Kelavkar, W. Glasgow, T.E. Eling, The effect of 15-lipoxygenase-1 expression on cancer cells., *Curr. Urol. Rep.* 3 (2002) 207–14.
- [301] J.A. Han, J. Kim, P.P. Ongusaha, D.H. Hwang, L.R. Ballou, A. Mahale, et al., P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis., *EMBO J.* 21 (2002) 5635–44.
- [302] A. Greenhough, H.J.M. Smartt, A.E. Moore, H.R. Roberts, A.C. Williams, C. Paraskeva, et al., The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment., *Carcinogenesis*. 30 (2009) 377–86.
- [303] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 97–120.
- [304] E.-M. Choi, J.-I. Heo, J.-Y. Oh, Y.-M. Kim, K.-S. Ha, J.-I. Kim, et al., COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328 (2005) 1107–12.
- [305] C.J. Sweeney, M.S. Marshall, D.S. Barnard, D.K. Heilman, S.D. Billings, L. Cheng, et al., Cyclo-oxygenase-2 expression in primary cancers of the lung and bladder compared to normal adjacent tissue, *Cancer Detect. Prev.* 26 (2002) 238–244.
- [306] E. Molina-Holgado, S. Ortiz, F. Molina-Holgado, C. Guaza, Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes., *Br. J. Pharmacol.* 131 (2000) 152–9.
- [307] A.G. Eliopoulos, C.D. Dumitru, C. Wang, J. Cho, P.N. Tsichlis, Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals., *EMBO J.* 21 (2002) 4831–40.
- [308] J. Ke, X. Long, Y. Liu, Y.F. Zhang, J. Li, W. Fang, et al., Role of NF-kappaB in TNF-alpha-induced COX-2 expression in synovial fibroblasts from human TMJ., *J. Dent. Res.* 86 (2007) 363–7.
- [309] A.S.L. Cheng, H.L.Y. Chan, W.K. Leung, N. Wong, P.J. Johnson, J.J.Y. Sung, Specific COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells., *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 113–9.
- [310] A. Billich, F. Bornancin, D. Mechtcheriakova, F. Natt, D. Huesken, T. Baumruker, Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function

- in cell survival and IL-1 β and TNF- α induced production of inflammatory mediators., *Cell. Signal.* 17 (2005) 1203–17.
- [311] J.E. König, T. Senge, E.P. Allhoff, W. König, Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer., *Prostate.* 58 (2004) 121–9.
 - [312] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, R.N. DuBois, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells., *Cell.* 93 (1998) 705–16.
 - [313] M. Kömhoff, Y. Guan, H.W. Shappell, L. Davis, G. Jack, Y. Shyr, et al., Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas., *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 29–35.
 - [314] M. Luo, N. Flamand, T.G. Brock, Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleus., *Biochim. Biophys. Acta.* 1761 (2006) 618–25.
 - [315] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology., *Science.* 294 (2001) 1871–5.
 - [316] J.Z. Haeggström, Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50639–42.
 - [317] F.-M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascués, A.I. Lamond, The multifunctional nucleolus., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 574–85.
 - [318] R. Bernardi, P.P. Pandolfi, Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 1006–16.
 - [319] P. Brand, T. Lenser, P. Hemmerich, Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells., *PMC Biophys.* 3 (2010) 3.
 - [320] K. Bishayee, A.R. Khuda-bukhsh, 5-Lipoxygenase Antagonist therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy 5-LOX: Key Enzyme in Leukotriene Biosynthesis Involvement of 5-LOX Metabolites in Angiogenesis Involvement of 5-LOX Metabolites in Tumor Cell Proliferation, 45 (2013) 709–719.
 - [321] A.L. Gartel, A.L. Tyner, The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis., *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 639–649.
 - [322] B.O. Wittschieben, R.D. Wood, DDB complexities, DNA Repair (Amst). 2 (2003) 1065–1069.
 - [323] K. Onel, C. Cordon-Cardo, MDM2 and prognosis., *Mol. Cancer Res.* 2 (2004) 1–8.
 - [324] S. Shangary, S. Wang, Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 5318–5324.
 - [325] J.Y. Lim, J.H. Oh, J.R. Jung, S.M. Kim, C.H. Ryu, H.-T. Kim, et al., MK886-induced apoptosis depends on the 5-LO expression level in human malignant glioma cells., *J. Neurooncol.* 97 (2010) 339–46.

- [326] D.D. Rao, J.S. Vorhies, N. Senzer, J. Nemunaitis, siRNA vs. shRNA: Similarities and differences, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 746–759.
- [327] P.C. Scacheri, O. Rozenblatt-Rosen, N.J. Caplen, T.G. Wolfsberg, L. Umayam, J.C. Lee, et al., Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 1892–1897.
- [328] S. Gu, L. Jin, Y. Zhang, Y. Huang, F. Zhang, P.N. Valdmans, et al., The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo, *Cell.* 151 (2012) 900–911.
- [329] Z. Wang, D.D. Rao, N. Senzer, J. Nemunaitis, RNA interference and cancer therapy, *Pharm. Res.* 28 (2011) 2983–2995.
- [330] F. Cianchi, C. Cortesini, L. Magnelli, E. Fanti, L. Papucci, N. Schiavone, et al., Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells., *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 2716–26.
- [331] J. Ghosh, C.E. Myers, Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13182–13187.
- [332] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.* 22 (2014) 526–539.

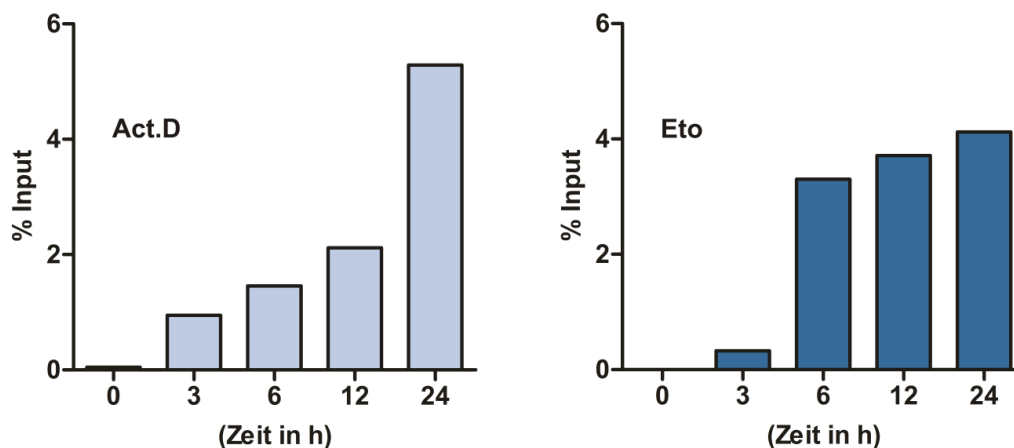
Anhang

A.1 Chromatin-Immunopräzipitation-Zeitreihe

Für die Bindungsstudie wurden U2OS-Zellen mit jeweils 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 3h, 6h, 12h, 24h) geerntet. Das Chromatin wurde, wie unter 2.2.12 beschrieben, aus den Zellen isoliert und mittels ChIP untersucht. Für die Immunopräzipitation der fixierten Protein-DNA-Komplexe wurde der Antikörper α -Maus-p53 (DO-1, 2 μ g) eingesetzt. Sowohl für *ALOX5* als auch für *CDKN1A* wurden spezielle Primer verwendet (Intron-G *ALOX5*; Promotorbereich *CDKN1A*). Zur Normalisierung der amplifizierten Fragmente wurde für alle Ansätze der Input mitgeführt. Als Kontrollregion wurde ein nicht regulatorischer DNA-Bereich (Gen Myoglobin) gewählt.

Wie anhand der Protein-DNA-Bindungsstudie hervorgeht, konnte eine zeitabhängige Zunahme der p53-Bindung beobachtet werden.

A α -p53(DO-1)-ChIP für *ALOX5*



B α -p53(DO-1)-ChIP für *CDKN1A*

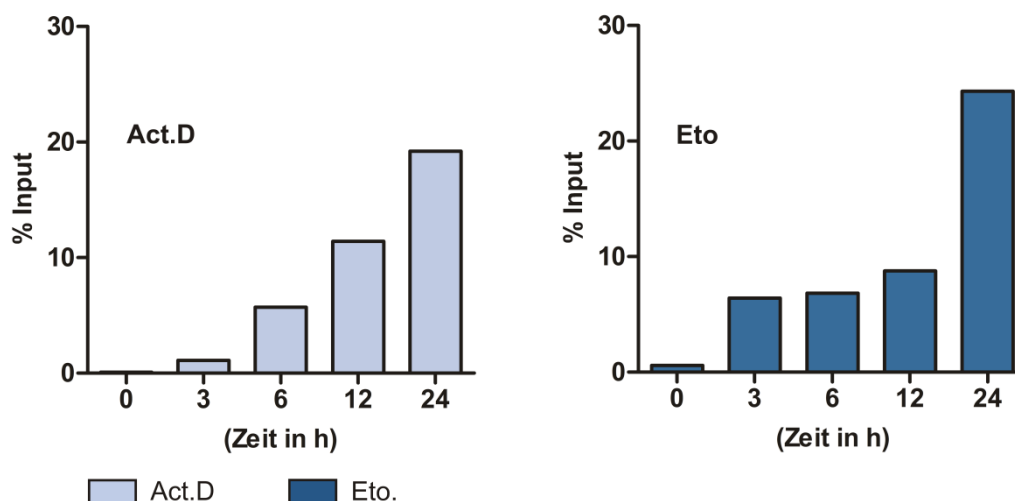


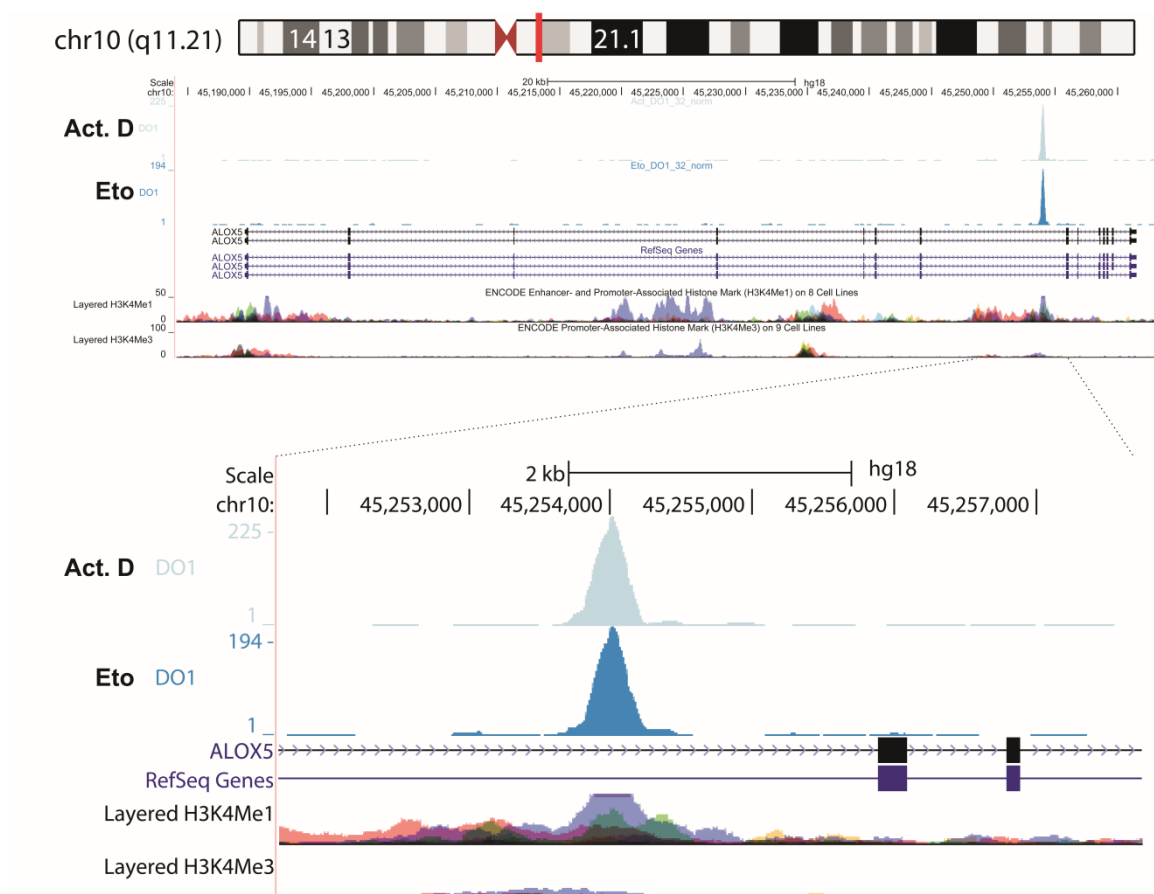
Abbildung A1. ChIP-RTqPCR für den Transkriptionsfaktor p53(α -p53 DO-1).

U2OS-Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto für 0, 3, 6, 12 oder 24 h behandelt, mit 1% Formaldehyd-Lsg. fixiert und anschließend lysiert. Die Präzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen p53 (α -p53 DO-1). Die geChIPte DNA wurde mittels RT-qPCR amplifiziert und analysiert. Die verwendeten Primerpaare binden bei *CDKN1A* im Bereich des Promotors, wohingegen die Primer gegen *ALOX5* im Intron-G binden. Als interne Negativkontrolle diente das Gen Myoglobin (myo). Es wurden jeweils die Änderungen der %-Input-Werte (Prozent der eingesetzten DNA) berechnet. (A) Bindung von p53 an das Gen *ALOX5* nach Act.D- und Eto-Behandlung (B). Bindung von p53 an das Gen *CDKN1A* nach Act.D- und Eto-Behandlung.

A.2 ChIP-Seq-basierte Identifizierung der *ALOX5*-DNA-Bindestellen von p53

Mit Hilfe der ChIP-Seq konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die chromosomale DNA von *ALOX5* nachgewiesen werden. Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurde der Antikörper (DO-1), welcher gegen p53 gerichtet ist, eingesetzt. Wie in der Abbildung A2 zu erkennen ist, ist das Gen *ALOX5* auf dem Chromosom 10q11.21 lokalisiert. Dargestellt ist die Bindung von p53 an den nicht-kodierenden Bereich der IntronG Sequenz.

A



B

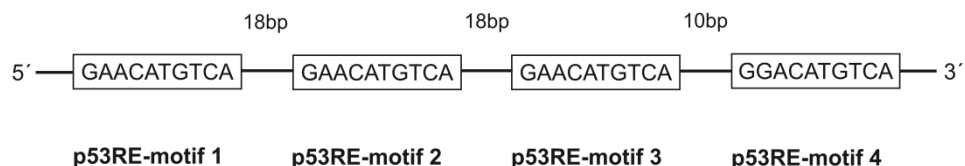


Abbildung A2. Genomweite ChIP-Seq-Analyse von p53 an die Bindesequenz von *ALOX5*.

Dargestellt ist eine ChIP-Seq-Analyse, welche die genomische Bindung von p53 an die IntronG-Sequenz des Gens *ALOX5* zeigt (A). Die Sequenzierungsdaten wurden mittels UCSC Genome Browser visualisiert und charakterisiert. Die Identifizierung der Binderegion erfolgte unter Verwendung des Antikörpers (DO-1). Die Normierung der Amplifikation wurde auf den Input bezogen. (B) p53 Konsensus-Bindestellen (4 x RRRCWWGYYY mit 0-18 bp Spacer [R = Purin, W = A oder T und Y = Pyrimidin]) innerhalb der IntronG Sequenz.

A.3 Zellzyklusanalyse – PI-Staining

Zellzyklusprofil von U2OS-Zellen; Analyse mittels FACS-Messung und anschließender Quantifizierung über die Software MotFit LT-V3.3.11 (MAC). Die abgebildeten Profile repräsentieren sechs unabhängige Experimente die in Abbildung 12 zusammengefasst dargestellt sind.

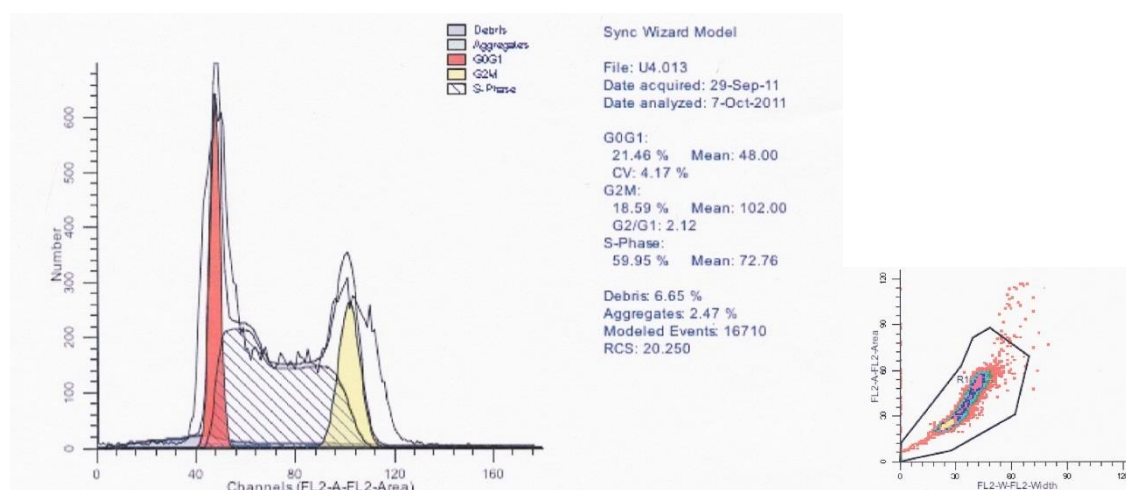


Abbildung A3. Zellzyklusanalyse unbehandelter U2OS-Zellen

Es wurden 2×10^6 U2OS-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden kultiviert (unbehandelt). Die geernteten Zellen wurden in 0,6 ml einer 1%-igen FCS/PBS-Lsg. aufgenommen und mit 1,4 ml 100% kaltem EtOH fixiert. Nach Zugabe von 200 µg/ml RNaseA (Roche) und 5 µg/ml Propidiumiodidlösung (20 min Inkubation) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus im FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2 Kanal.

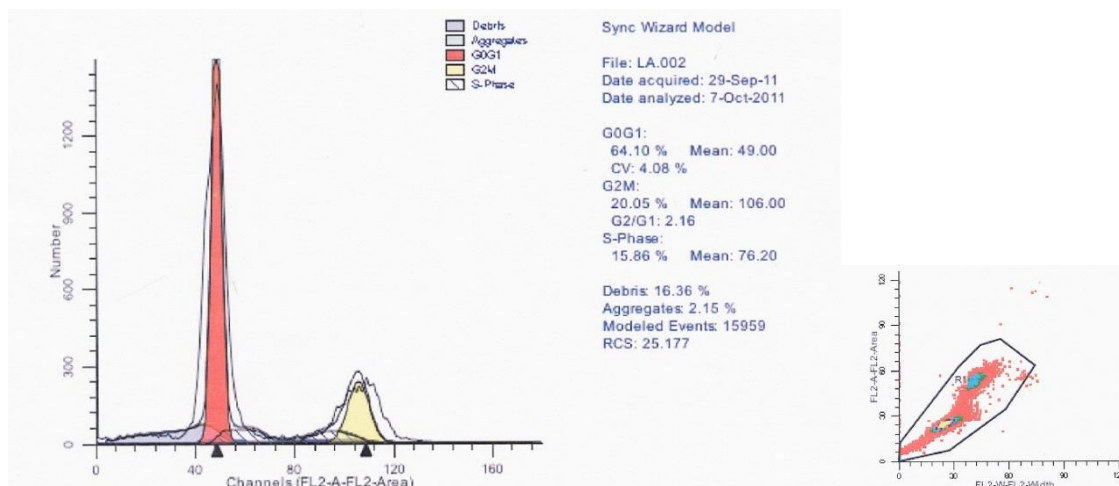


Abbildung A4. Zellzyklusanalyse Act.D behandelte U2OS-Zellen

Es wurden 2×10^6 U2OS-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden mit 5 nM Act.D behandelt. Die geernteten Zellen wurden in 0,6 ml einer 1%-igen FCS/PBS-Lsg. aufgenommen und mit 1,4 ml 100% kaltem EtOH fixiert. Nach Zugabe von 200 µg/ml RNaseA (Roche) und 5 µg/ml Propidiumiodidlösung (20 min Inkubation) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus im FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2 Kanal.

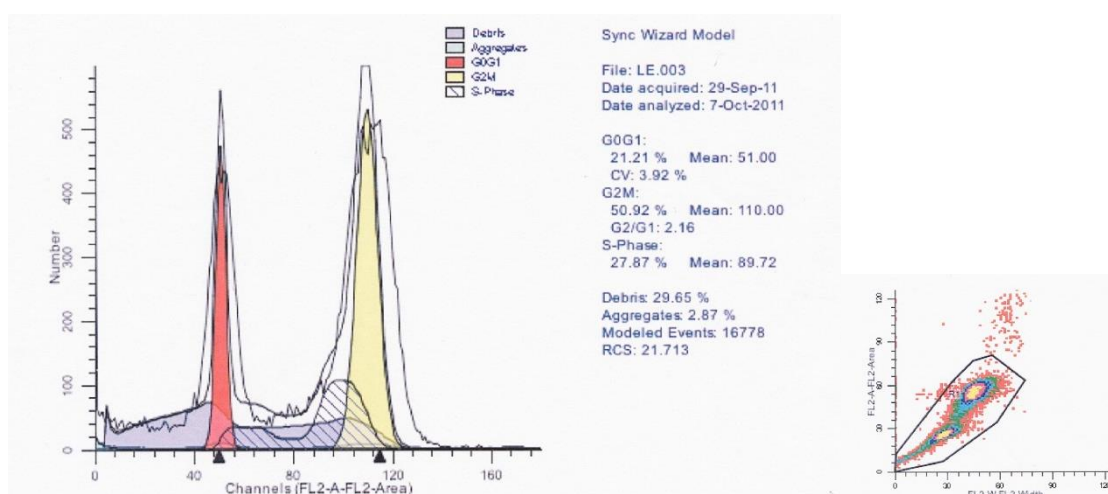


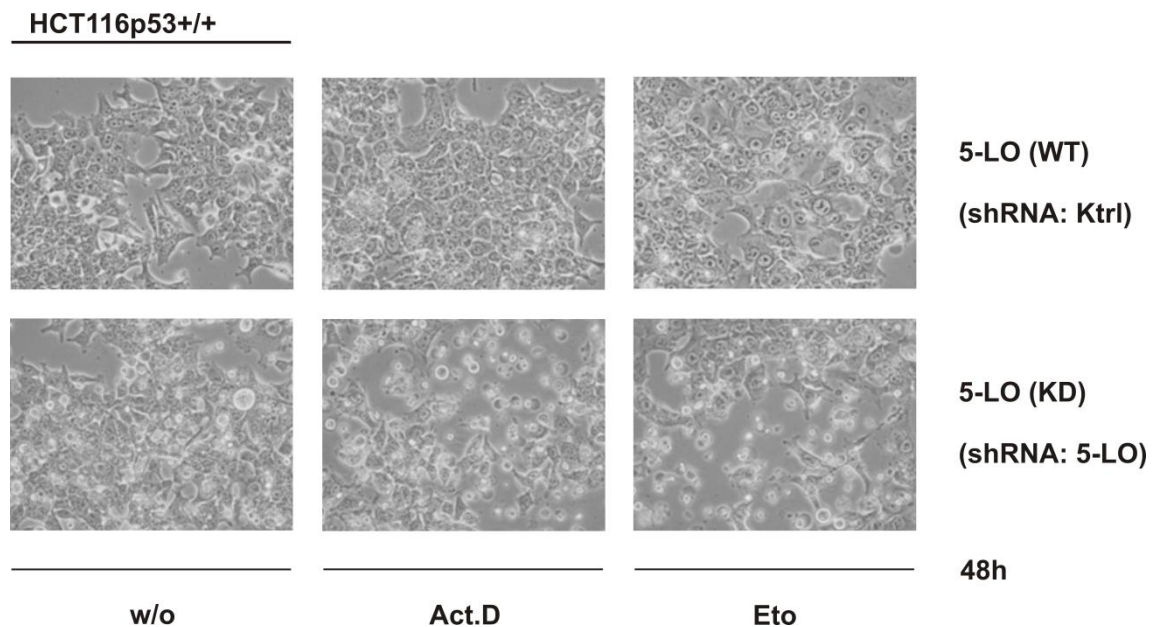
Abbildung A5. Zellzyklusanalyse Eto behandelte U2OS-Zellen

Es wurden 2×10^6 U2OS-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden mit 10 µM Eto behandelt. Die geernteten Zellen wurden in 0,6 ml einer 1%-igen FCS/PBS-Lsg. aufgenommen und mit 1,4 ml 100% kaltem EtOH fixiert. Nach Zugabe von 200 µg/ml RNaseA (Roche) und 5 µg/ml Propidiumiodidlösung (20 min Inkubation) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus im FACS-Calibur (BD FACSCalibur™) im FL-2 Kanal.

A.4 Untersuchung der Zellmorphologie von 5-LO-Knockdown-Zellen mittels Durchlichtmikroskop

Untersucht wurde die Zellmorphologie von 5-LO-Knockdown Zellen 48 Stunden nach Behandlung mit 5 nM Act.D und 10 μ M Eto. Abbildung A6 zeigt repräsentative Bilder der 5-LO-Knockdown-Zellen HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}.

Zellen, die 5-LO exprimieren, wiesen ein höheres Wachstum auf (Abbildung A6, oben; Ktrl) verglichen mit Zellen verminderter 5-LO-Expression (Abbildung A6, unten; 5-LO-shRNA). In beiden 5-LO-Knockdown-Zelllinien (HCT116p53^{+/+} und HCT116p53^{-/-}) waren deutlich mehr tote Zellen zu erkennen als in den Kontrollzellen.



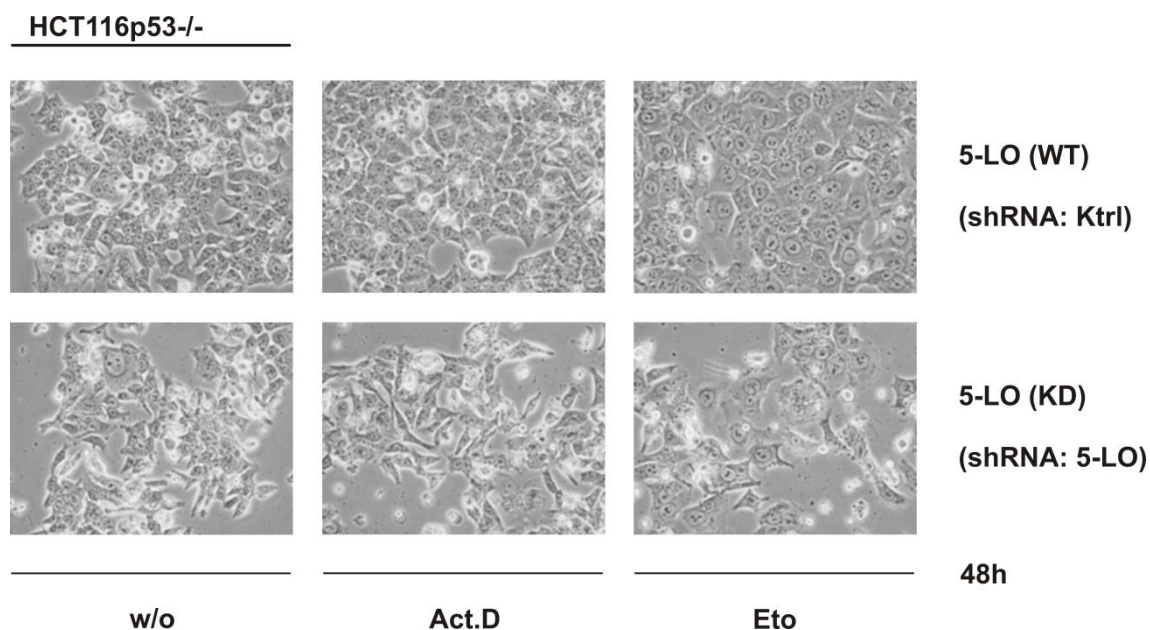


Abbildung A6. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der 5-LO-Knockdown-HCT116-Zellen.

Nachdem die HCT116p53^{+/-} und HCT116p53^{-/-}-Zellen für 8 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert wurden, erfolgte die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Für den Knockdown der 5-LO (5-LO-KD) wurde shRNA (Sigma®) verwendet. Als Kontrollplasmid diente der Leervektor (pLKO.1-puro, 5-LO-WT). Nach der Selektion wurden 1 x 10⁵ HCT116-Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und für 48 Stunden mit 5 nM Act.D oder 10 µM Eto behandelt. Die Zellen wurden mittels Durchlichtmikroskop abgelichtet. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

A.5 Analyse der Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown-Zellen

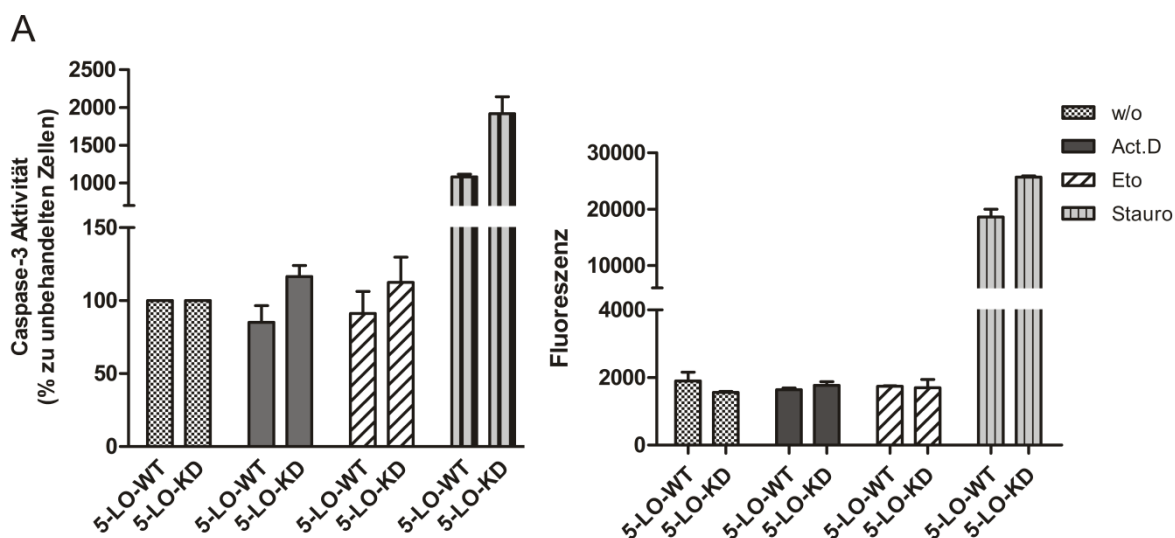
Die Effektor-Caspase-3 ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Caspase-abhängigen Apoptose. Die Untersuchung der Caspase-3 Aktivität wurde in jeweils drei verschiedenen 5-LO-Knockdown Zelllinien durchgeführt: in U2OS-, HCT116p53^{+/-} und HCT116p53^{-/-} Zellen.

Hierzu wurde eine fluorometrische Aktivitätsstudie durchgeführt, in der das Spaltprodukt des Caspase-3 Substrats (Ac-DEVD-AMC) untersucht wurde. Des Weiteren wurden in Western Blot-Analysen Caspase-3 Spaltprodukte untersucht. Bei der Aktivierung der Caspase-3 kommt es nach der Zugabe eines synthetischen Substrats, welches an einem Fluorophor gekoppelt ist, zu dessen Spaltung. Die direkt proportional zur Aktivität des Enzyms erhöhte Fluoreszenz konnte anschließend mittels Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.) detektiert werden (λ Exzitation bei 380 nm und λ Emission bei

460 nm). Staurosporin (4 μ M) wurde in diesen Experimenten als Positivkontrolle verwendet. Staurosporin induziert Apoptose und aktiviert die Caspase über den intrinsichen, mitochondrialen Signalweg. Aufgrund seiner hohen Toxizität gegenüber gesunden Zellen wird Staurosporin nicht im therapeutischen Einsatz in der Onkologie verwendet [332].

Die Abbildungen A7, 8 und 9 geben die Ergebnisse der fluorometrischen Aktivitätsstudien wieder. Für keine der untersuchten Zelllinien konnte ein signifikanter Unterschied der Caspase-3-Aktivität zwischen den 5-LO-Knockdown- und den Kontrollzellen ermittelt werden. Für U2OS-Zellen war ein leichter Anstieg der Caspase-3-Aktivität zu beobachten, während die Aktivität in den untersuchten HCT116-Zellen sank. Auch auf Proteinebene konnten keine Unterschiede zwischen 5-LO-Knockdown und Kontrolle festgestellt werden. Die untersuchten Zellen wiesen nur eine schwache Caspase-3-Aktivität sowie eine geringfügige Spaltungen der Procaspase auf.

A.5.1 Analyse der Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown-U2OS-Zellen



B

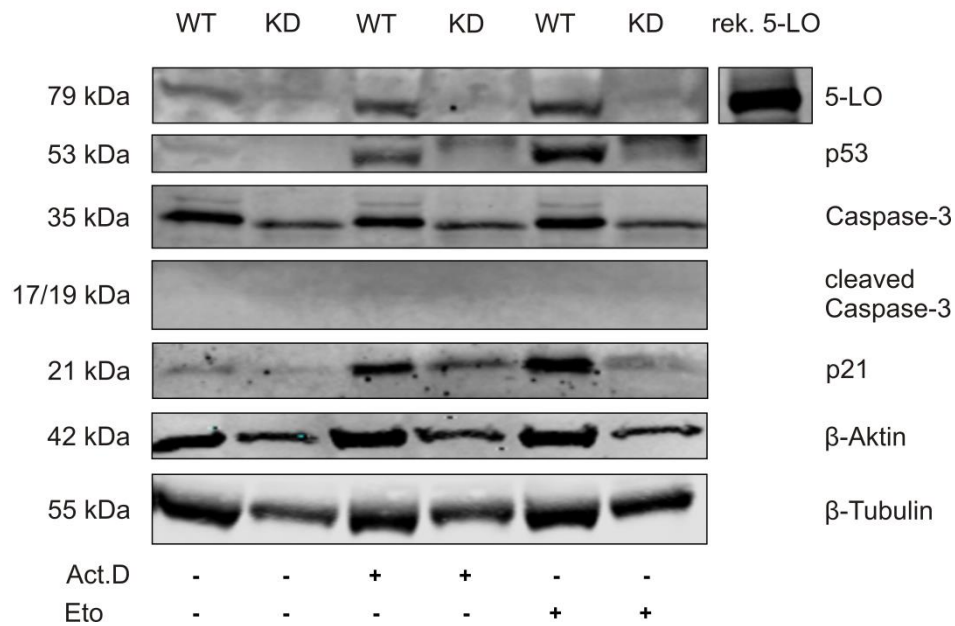


Abbildung A7. Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown-U2OS-Zellen.

(A) 5-LO-Knockdown-U2OS-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^6 in 10 cm Kulturschalen ausgesät, für 24 Stunden mit 5 nM Act.D, 10 μ M Eto oder 4 μ M Staurosporin (Stauro) behandelt und anschließend lysiert. Pro Ansatz wurden 250 μ g Protein in einem Volumen von 50 μ l in eine schwarze 96-Well Platte überführt und anschließend mit 40 μ mol/L (in jeweils 50 μ l) Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC) für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Messung (λ Exzitation bei 380 nm und λ Emission bei 460 nm) am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.) Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. (B) Die Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 24 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000), p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000), Caspase-3 (α -Kaninchen-Casp-3, Cell Signaling, 1:500), cleaved Caspase-3 (α -Kaninchen-cleaved-Casp-3, Cell Signaling, 1:500) p21 (α -Maus-p21, Cell Signaling, 1:2000) sowie der Ladekontrollen β -Aktin und β -Tubulin. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

A.5.2 Analyse der Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown-HCT116p53^{+/±}-Zellen

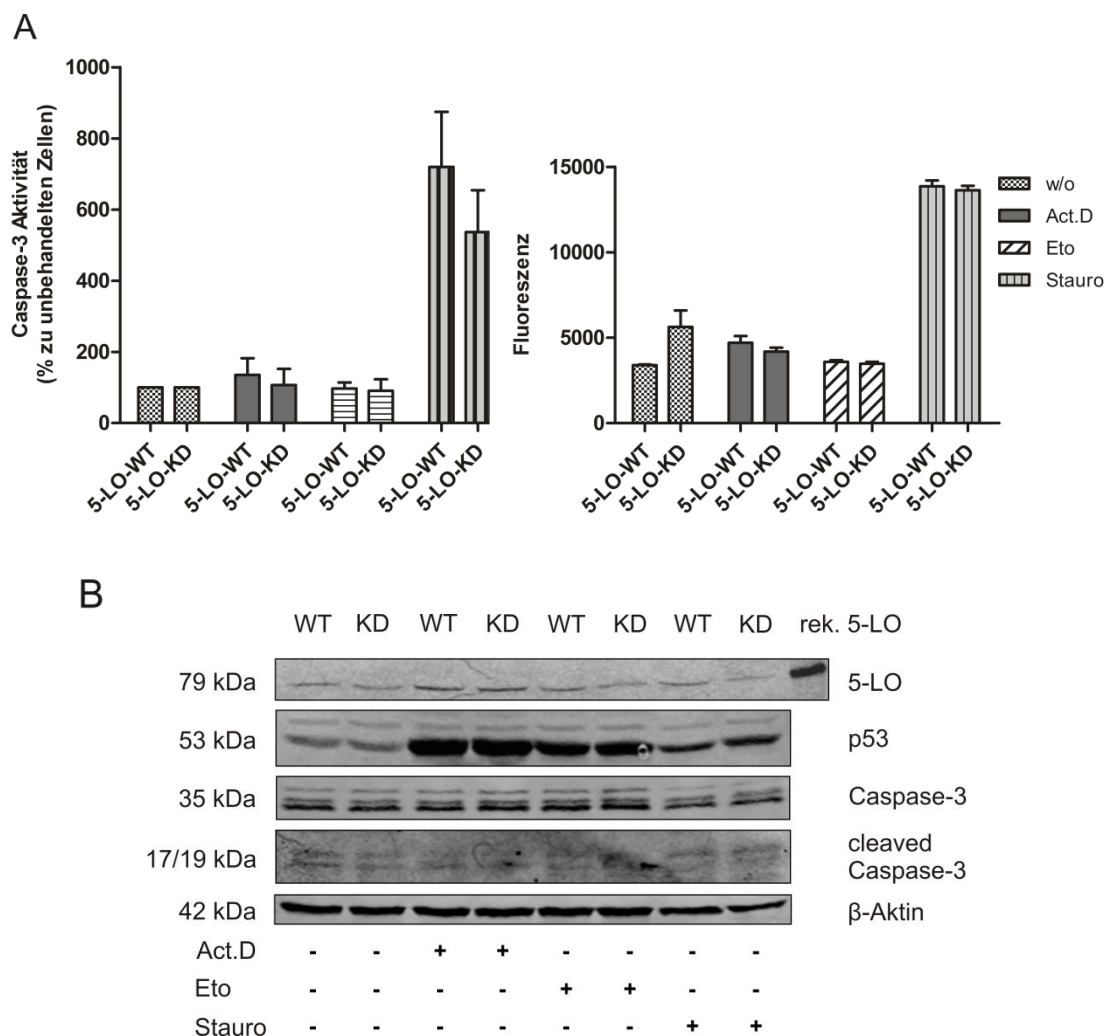


Abbildung A8. Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown- HCT116p53^{+/±}-Zellen.

(A) 5-LO-Knockdown-HCT116p53^{+/±}-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^6 in 10 cm Kulturschalen ausgesät, für 24 Stunden mit 5 nM Act.D, 10 μ M Eto oder 4 μ M Staurosporin (Stauro) behandelt und anschließend lysiert. Pro Ansatz wurden 250 μ g Protein in einem Volumen von 50 μ l in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und anschließend mit 40 μ mol/L (in jeweils 50 μ l) Caspase-3 Substrat (Ac-DEVD-AMC) für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Messung (λ Exzitation bei 380 nm und λ Emission bei 460 nm) am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.). Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. (B) Die Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 24 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000), p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000), Caspase-3 (α -Kaninchen-Casp-3, Cell Signaling, 1:500) und cleaved Caspase-3 (α -Kaninchen-cleaved-Casp-3, Cell Signaling, 1:500) p21 (α -Maus-p21, Cell Signaling, 1:2000) sowie der Ladekontrolle β -Aktin. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

A.5.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown- HCT116p53^{-/-}-Zellen

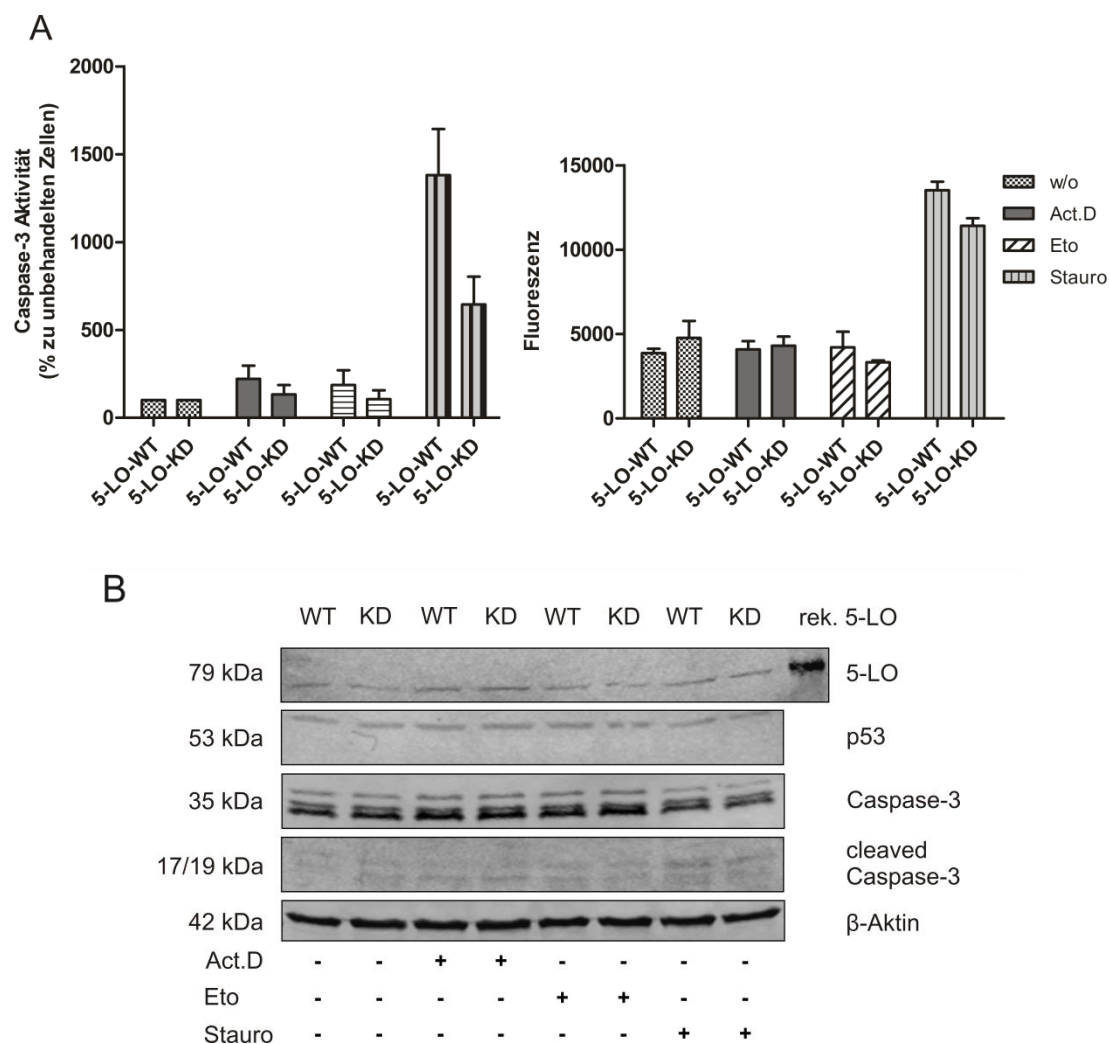
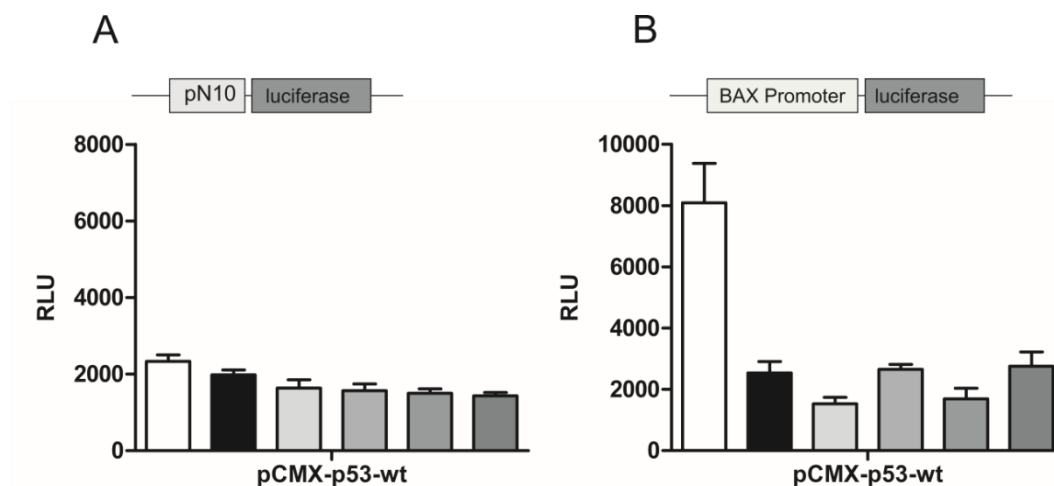


Abbildung A9. Caspase-3-Aktivität in 5-LO-Knockdown-HCT116p53^{-/-}-Zellen.

(A) 5-LO-Knockdown-HCT116p53^{-/-}-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^6 in 10 cm Kulturschalen ausgesät, für 24 Stunden mit 5 nM Act.D, 10 μ M Eto oder 4 μ M Staurosporin (Stauro) behandelt und anschließend lysiert. Pro Ansatz wurden 250 μ g Protein in einem Volumen von 50 μ l in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und anschließend mit 40 μ mol/L (in jeweils 50 μ l) Caspase-3 Substrat (Ac-DEVD-AMC) für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Messung (λ Exzitation bei 380 nm und λ Emission bei 460 nm) am Tecan-infinite®M200 (Fa. Tecan Group Ltd.). Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. (B) Die Zellen wurden mit 5 nM Act.D oder 10 μ M Eto inkubiert und nach 24 Stunden extrahiert. Es wurden jeweils 150 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dargestellt ist die Expression von 5-LO (α -Maus-5-LO, BD, 1:1000), p53 (α -Maus-p53, DO-1, 1:1000), Caspase-3 (α -Kaninchen-Casp-3, Cell Signaling, 1:500) und cleaved Caspase-3 (α -Kaninchen-cleaved-Casp-3, Cell Signaling, 1:500) p21 (α -Maus-p21, Cell Signaling, 1:2000) sowie der Ladekontrolle β -Aktin. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E.coli*.

A.6 Reporteranalysen zur Untersuchung des Einflusses der 5-LO auf die p53-Promotor-/Enhancer-Aktivität

Um den Einfluss von 5-LO auf die Regulation von p53 genauer zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Reportergenkonstrukten sowie mit den Expressionsplasmiden pCMX-p53-WT (Wildtyp p53) und pcDNA3.1, pcDNA3.1-5LO, pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q transient kotransfiziert. Mit Hilfe des Luciferase Assay Reporter Kit (Promega) wurde die relative Menge an aktiven Luciferase-Enzym anhand des emittierenden Lichts 40 Stunden nach Transfektion ermittelt (dargestellt in RLU - Relative Light Units). Zusätzlich wurde der Einfluss der überexprimierten 5-LO auf das p53-regulierte Targetgen Bax-Luc analysiert. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Khalil Ahmad durchgeführt.



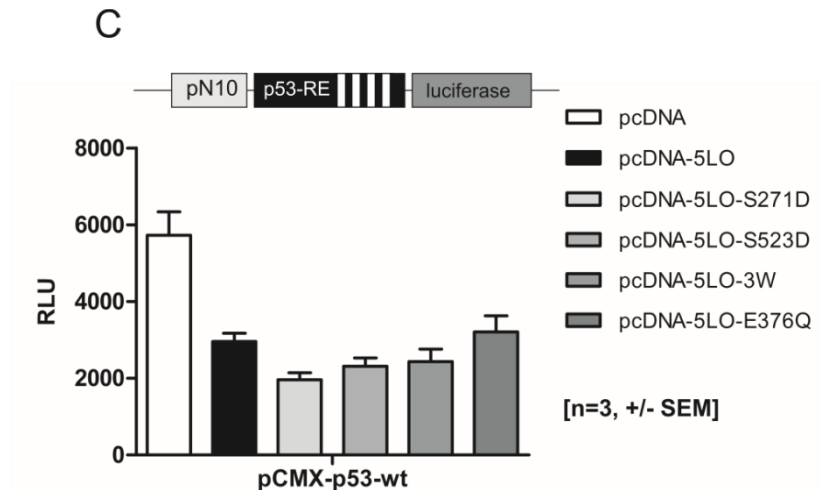


Abbildung A10. Hemmung der transkriptionellen p53-Aktivität durch überexprimierte 5-LO.

Die Zelllinie HEK293T wurde mit den Reportergenkonstrukten pN10, pN10-IntronG-p53 oder Bax-Luc, den Expressionsplasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-5LO, pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5-LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q, pCGN, pCMX-p53-wt sowie der Renilla-Kontrolle kotransfiziert. 40 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mittels Dual-Glo® Luciferase-Assay-System gemessen. Die Aktivität ist in RLU (Einheit: *relative light units*) angegeben und repräsentiert jeweils drei unabhängige Experimente. Diese Daten wurden in Kooperation mit Khalil Ahmad erhoben. (A) Kotransfizierte HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden pCGN, pCMX-p53-wt (Wildtyp p53), pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO, pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5-LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q sowie dem Reportergenkonstrukt pN10-IntronG-p53. B) Kotransfizierte HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden pCGN, pCMX-p53-wt (Wildtyp p53), pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO, pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5-LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q sowie dem Reportergenkonstrukt Bax-Luc. C) Kotransfektion der Zellen mit dem pCMX-p53-wt, pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-5LO, pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5-LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q sowie dem Reportergenkonstrukt pN10 zur Kontrolle.

Wie in Abbildung A10 zu erkennen ist, führt die gleichzeitige Überexpression der mutierten 5-LO (pcDNA3.1-5LO-S271D, pcDNA3.1-5-LO-S523D, pcDNA3.1-5LO-3W, pcDNA3.1-5LO-E376Q) und p53 ebenso zu einer Reduktion der BAX- und 5-LO-Promotoraktivität.

In beiden Transfektionen ist eine deutliche und signifikante Abnahme bis zu $\leq 50\%$ zu beobachten, $***p < 0,001$ (two-way ANOVA, Bonferroni's Post-Hoc-Test). Aktiviertes p53 induziert die Transkription von *ALOX5*, welches wiederum durch die zuvor gezeigte Bindung an p53 dessen Funktion reprimiert, und somit in der Lage ist, direkt die transkriptionelle Funktion von p53 einzuschränken.

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe danken. Er ermöglichte mir die Fertigstellung meiner Dissertation durch seine sehr engagierte, motivierende und kompetente Betreuung.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Dr. Beatrix Süß, Fachbereich Biologie, für die Betreuung dieser Arbeit von seitens der Technischen Universität Darmstadt danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha, Fachbereich Biologie (TUD), für seine Bereitschaft als Koreferent zu fungieren.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Tomohiro Chiba, Institut für Pathologie der Universität Kyorin (Tokio), für seine sehr große Hilfe und für seine immer gute Laune.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Steinhilber für die herzliche Aufnahme, die nette Atmosphäre sowie für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche darüber hinaus beim Kaffee und Kuchen. Zudem möchte ich mich für eure vorbildliche Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank für diese sehr schöne Zeit gilt allen voran Saskia Busch sowie Christoph Lehmann, Ricardo Capelo, Julia Martin, Kim Beilstein, Jessica Roos, Khalil Ahmad, Ann-Katrin Ball, Oleg Diehl, Simon Kretschmar, Ann-Kathrin Häfner, Maria-Christina Scherzberg, Jasmin Fettel, Friederike Scholl sowie allen weiteren und ehemaligen Mitarbeitern der Pharmazeutischen Chemie.

Besonders danken möchte ich noch einmal meiner Laborpartnerin und sehr guten Freundin Saskia Busch für die gemeinsame Zeit, die geteilte Frustration und für ihre unfassbar große Hilfsbereitschaft! Vielen Dank!

Ebenso möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit bei Jessica Roos und Khalil Ahmad bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Carlo Angioni für die Durchführung der LC-MS/MS-Messungen.

Sven George möchte ich meinen Dank aussprechen, für die sehr große Hilfsbereitschaft in Fragen Praktikum und Photometer ;-)

Herzlichen Dank auch an unsere gute Seele des Arbeitskreises, Renate Halfmann. Vielen lieben Dank, dass du immer für uns da bist! Du bist die Beste!

Ebenso möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Dietrich und Groner für die freundliche Aufnahme danken. Danke Axel Weber, Laura Mack, Natalia Delis, Denise Löscher und Viktoria von Manstein für die schöne und lustige Zeit mit euch.

Natürlich danke ich auch meinem Cousinchen Anja Stettner und meinem Kumpel Martin Walker, die mich seelisch und moralisch immer wieder unterstützt und aufgebaut haben! Tschakka! ☺

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit, für seine aufopfernde Hilfe und vor allem für seine Liebe geht mein herzlichster Dank an meinen Freund Christoph Lehmann. Ich danke dir für dein Verständnis, für das stetige Mut zusprechen in dieser schwierigen Zeit (10!).

Nicht zuletzt möchte ich meiner gesamten, riesigen Familie danken, ohne deren Hilfe ich nie so weit gekommen wäre. Von ganzem Herzen danke ich euch für eure jahrelange Unterstützung und vor allem an den Glauben an mich. Einen ganz besonderen Dank an die beste Mama der Welt, an meinen Papa&Conny, Christina&Stephan, Olli&Ralf und an alle die mich unterstützt haben!

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Bianca Gilbert
Geburtsdatum	13.11.1983 Frankfurt a.M., Deutschland

Hochschulausbildung

04.2010–03.2015	Promotionsarbeit am Institut für Tumorbiologie und experimentelle Therapie (Georg-Speyer-Haus) und am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe Universität Frankfurt am Main.
-----------------	---

Thema der Doktorarbeit:

„Die Charakterisierung der humanen 5-Lipoxygenase als direktes Targetgen des Tumorsuppressors p53 und seine Relevanz für die Tumorgenese“

06.2009–03.2010	Diplomarbeit in der Gruppe „Angewandte Virologie und Gentherapie“ der AG Dietrich mit dem Thema: Selektion von Lassa-Fieber-Virus spezifischen VHH Antikörperfragmenten aus einer synthetischen Kameliden-Antikörper-Bibliothek (Georg-Speyer-Haus)
-----------------	---

10.2004–03.2010	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit den Schwerpunkten Biochemie, Mikrobiologie und Pflanzenphysiologie
-----------------	--

Schul Ausbildung

08.2001–04.2004	Technische Gymnasium an der Ludwig-Geißler-Schule in Hanau
08.1994–07.2001	Realschule der Bachschule in Offenbach
08.1990–07.1994	Grundschule Eichendorffschule in Offenbach

Konferenzen

2014	Istanbul: Fifth European Workshop on Lipid Mediators; Poster
2014	Frankfurt: DPHG Jahrestagung “Trends and Perspectives in Pharmaceutical Sciences”
2013	Puerto Rico: Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, 13th International Conference; Poster
2013	Obergurgl: Winter School des Dr. Hans Kröner-Graduiertenkolleg FIRST; Vortrag
2010	Warwick: “Genes and Cancer Meeting”; Poster

Publikationen

B. Gilbert, K. Ahmad, J. Roos, C. Lehmann, T. Chiba, S. Ulrich-Rückert, et al., 5-Lipoxygenase is a direct p53 target gene in humans, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849 (2015) 1003–1016.

L. Smeenk, S.J. van Heeringen, M. Koepfel, **B. Gilbert**, E. Janssen-Megens, H.G. Stunnenberg, *et al.*, Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation., *PLoS One.* 6 (2011) e17574.

B.M. Kaminski, A. Weigert, M.-C. Scherzberg, S. Ley, **B. Gilbert**, K. Brecht, *et al.*, Resveratrol-induced potentiation of the antitumor effects of oxaliplatin is accompanied by an altered cytokine profile of human monocyte-derived macrophages., *Apoptosis*. 19 (2014) 1136–47.

Zusätzliche Berufserfahrung

11.2012–03.2015	Assistentin für das Praktikum: “Biochemische Untersuchungsmethoden und klinische Chemie für Pharmazeuten“
2009–2011	Organisation und Betreuung der Veranstaltung Benefiz-Regatta „Rudern gegen Krebs“
03.2009–04.2009	Tutor des Fortgeschrittenen Praktikums in der Mikrobiologie (TU Darmstadt)
2009	Organisation und Betreuung der Veranstaltung Welt-AIDS-Tag 2009
08.2007–10.2007	Praktikum im Paul-Ehrlich-Institut Bundesamt für Sera und Impfstoffe in Langen in der Abteilung Medizinische Biotechnologie/Xenogene Zelltherapeutika (Prof. Dr. Ralf R. Tönjes)